

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-503012

(43)公表日 平成11年(1999)3月23日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/70	A B F	A 6 1 K 31/70	A B F
	A B S		A B S
	A B U		A B U
	A C D		A C D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-529302
(86) (22)出願日 平成7年(1995)3月30日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)9月30日
(86)国際出願番号 PCT/US96/04079
(87)国際公開番号 WO96/30406
(87)国際公開日 平成8年(1996)10月3日
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, CN, JP, K R, MX, NZ, US

(71)出願人 ヒューマン ジノーム サイエンス、
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド 20850-
3338, ロックビル, キー ウェスト アベ
ニュー 9410
(72)発明者 リ, イ
アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
ガイザースバーグ, ホワード ランディン
グ ドライブ 16125
(72)発明者 カオ, リアン
香港 モンマウス テラス, サンクレスト
タワー 18ビー
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトGタンパク質結合レセプター

(57)【要約】

ヒトGタンパク質結合レセプターポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするDNA(RNA)および転換え技術によりこのようなポリペプチドを産生する手順が開示される。このようなポリペプチドに対するアンタゴニストおよびアゴニストを同定するためのこのようなポリペプチドを利用する方法、ならびにGタンパク質結合レセプターポリペプチドの過剰発現および過剰発現に関連する状態を処置するためにアゴニストおよびアンタゴニストを使用する方法もまた、それぞれ開示される。Gタンパク質結合レセプター核酸配列内の変異およびこのレセプターの可溶性型の変化したレベルを検出するための診断方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】

1. 以下からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、および配列番号8のポリペプチド、あるいは該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、または誘導体をコードするポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも50ヌクレオチドを有するフラグメント。

2. 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

3. 前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

4. 前記ポリヌクレオチドがゲノムDNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

5. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第75981号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも50ヌクレオチドを有するフラグメント。

6. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第75983号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメン

トが少なくとも50ヌクレオチドを有するフラグメント。

7. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第75976号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)リヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも50ヌクレオチドを有するフラグメント。

8. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第75979号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも50ヌクレオチドを有するフラグメント。

9. 配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

10. 配列番号1のヌクレオチド1～ヌクレオチド1713として示されるコード配

列を有する、請求項9に記載のポリヌクレオチド。

11. 配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

12. 配列番号3のヌクレオチド1～ヌクレオチド2185として示されるコード配列を有する、請求項11に記載のポリヌクレオチド。

13. 配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

14. 配列番号5のヌクレオチド1～ヌクレオチド1474として示されるコード配

列を有する、請求項13に記載のポリヌクレオチド。

15. 配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

16. 配列番号7のヌクレオチド1～ヌクレオチド1301として示されるコード配列を有する、請求項15に記載のポリヌクレオチド。

17. 請求項2に記載のDNAを含有するベクター。

18. 請求項17に記載のベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞。

19. ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、請求項18に記載の宿主細胞から前記DNAによりコードされる該ポリペプチドを発現させる工程を包含する、プロセス。

20. ポリペプチドを発現し得る細胞を産生するためのプロセスであって、請求

項17に記載のベクターを用いて細胞を遺伝子操作する工程を包含する、プロセス。

21. 請求項2に記載のDNAとハイブリダイズ可能であり、かつGタンパク質結合レセプター活性を有するポリペプチドをコードする、単離されたDNA。

22. 以下からなる群から選択されるポリペプチド：

(i) 配列番号2、4、6および8の推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体を有するポリペプチド；

(ii) ATCC受託番号第75981号、ATCC受託番号第75983号、ATCC受託番号第75976号、ATCC受託番号第75979号のcDNAによりコードされるポリペプチド、ならびに該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体。

23. 請求項22に記載のポリペプチドに対する抗体。

24. 請求項22に記載のポリペプチドを活性化する化合物。

25. 請求項22のポリペプチドの活性化を阻害する化合物。

26. Gタンパク質結合レセプターの活性化の必要を有する患者の処置のための方法であって、請求項24に記載の化合物の治療有効量を該患者に投与する工程を包含する、方法。

27. Gタンパク質結合レセプターの活性化を阻害する必要を有する患者の処置のための方法であって、請求項25に記載の化合物の治療有効量を該患者に投与する工程を包含する、方法。

28. 前記ポリペプチドはGタンパク質結合レセプターの可溶性フラグメントで

あり、そして該レセプターのリガンドに結合し得る、請求項22に記載のポリペプチド。

29. 請求項22に記載のポリペプチドに対するアンタゴニストおよびアゴニスト同定するためのプロセスであって：

Gタンパク質結合レセプターを発現する細胞と既知のレセプターリガンドおよびスクリーニングされるべき化合物とを接触させる工程；および

該化合物が該レセプターの活性化を阻害するか、または増強するかを決定する工程、

を包含する、プロセス。

30. 請求項22に記載のポリペプチドに結合し得ることが公知でないリガンドが該ポリペプチドに結合し得るかを決定するためのプロセスであって：

Gタンパク質結合レセプターを発現する哺乳動物細胞と潜在的なリガンドとを接触させる工程；

該レセプターに結合する該リガンドの存在を検出する工程；および

該リガンドが該Gタンパク質結合レセプターに結合するかを決定する工程、
を包含するプロセス。

31. 宿主由来のサンプル中の請求項22に記載のポリペプチドをコードする核酸配列における変異を検出する工程を包含する、疾患または疾患に対する罹患性を診断するための方法。

32. 宿主由来のサンプル中の請求項28に記載のポリペプチドの存在を分析する工程を包含する、診断プロセス。

【発明の詳細な説明】

ヒトGタンパク質結合レセプター

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、このようなポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、このようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、ならびにこのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に関する。より詳細には、本発明のポリペプチドは、ヒトの7-膜貫通型レセプターである。この膜貫通レセプターは、時々本明細書以下で個々にGPR1、GPR2、GPR3、およびGPR4といわれるGタンパク質結合レセプターである。本発明はまた、このようなポリペプチドの作用を阻害することに関する。

多数の医学的に重要な生物学的プロセスが、Gタンパク質および/またはセカンドメッセンジャー（例えば、cAMP）を含むシグナル伝達経路に関与するタンパク質により媒介されることは、十分に確立されている（Lefkowitz, Nature, 351:353-354(1991)）。本明細書中では、これらのタンパク質を、Gタンパク質を用いた経路に関与するタンパク質またはPPGタンパク質という。これらのタンパク質のいくつかの例としては、GPCレセプター（例えば、アドレナリン作用性薬剤およびドーパミンに対するGPCレセプター（Kobilka, B.K.ら, PNAS, 84:46-50(1987); Kobilka, B.K.ら, Science, 238:650-656(1987); Bunzow, J.R.ら, Nature, 336:783-787(1988)）、Gタンパク質それ自体、エフェクタータンパク質（例えば、ホスホリパーゼC、アデニルシクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ）、ならびにアクチュエータータンパク質（actuator protein）（例えば、プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼC）（Simon, M.I.ら, science, 252:802-8(1991)）が挙げられる。

例えば、シグナル伝達の1つの形態では、ホルモン結合の効果は、細胞内における酵素アデニル酸シクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化は、ヌクレオチドGTPの存在に依存し、そしてGTPはまた、ホルモン結合に影響を与える。Gタンパク質は、ホルモンレセプターをアデニル酸シクラーゼに連結させる。Gタンパク質は、ホルモンレセプターにより活性化されると、GTPを結合型GDPに

変換することが示された。次いで、GTPを有する形態は、活性化されたアデニル酸シクラーゼに結合する。GTPのGDPへの加水分解は、Gタンパク質それ自体により触媒され、Gタンパク質を基底の不活性な形態に戻す。従って、Gタンパク質は、シグナルをレセプターからエフェクターに中継する中間物として、およびシグナルの持続時間を制御する時計としての2つの役割を果たす。

Gタンパク質結合レセプターの膜タンパク質遺伝子スーパーファミリーは、7つの推定上の膜貫通ドメインを有するものとして特徴づけられている。これらのドメインは、細胞外または細胞質ループにより結合された膜貫通 α ヘリックスを表すと考えられる。Gタンパク質結合レセプターは、ホルモン、ウイルス、増殖因子および神経レセプターのような広範囲の生物学的に活性なレセプターを含む。

Gタンパク質結合レセプターは、少なくとも8つの分岐した親水性ループを結合する、約20~30アミノ酸のこれらの7つの保存された疎水性の範囲を含むものとして特徴づけられている。結合レセプターのGタンパク質ファミリーの例として、ドーパミンレセプターが挙げられる。これは、精神病的および神経学的障害を処置するために使用される神経弛緩性薬物に結合する。このファミリーのメンバーの他の例としては、カルシトニン、アドレナリン作用性、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン様、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロロビン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシンおよびロドプシン、臭気物質、サイトメガロウイルスレセプターなどが挙げられる。

大部分のGタンパク質結合レセプターは、機能的なタンパク質構造を安定化させると考えられるジスルフィド結合を形成する最初の2つの細胞外ループの各々に単一の保存されたシステイン残基を有する。7つの膜貫通領域はTM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、およびTM7と命名されている。TM3はまたシグナル伝達に関連付けられている。

システイン残基のリン酸化および脂質化（パルミチル化またはファルネシル化）は、いくつかのGタンパク質結合レセプターのシグナル伝達に影響を与える。大部分のGタンパク質レセプターは、第3の細胞質ループおよび/またはカルボキシ末端内に潜在的なリン酸化部位を含有する。いくつかのGタンパク質結合レ

セプター（例えば、 β -アドレノレセプター）について、プロテインキナーゼA

および/または特異的なレセプターキナーゼによるリン酸化は、レセプター脱感作を媒介する。

Gタンパク質結合レセプターのリガンド結合部位は、いくつかのGタンパク質結合レセプター膜貫通ドメインにより形成される親水性受口(socket)を含有すると考えられ、この受口はGタンパク質結合レセプターの疎水性G残基により囲まれている。各Gタンパク質結合レセプター膜貫通ヘリックスの疎水性側は内側に向いており、そしてイオン化リガンド結合部位を形成すると仮定されている。TM3は、リガンド結合部位（例えば、TM3のアスパラギン酸残基を含む）を有するとして、いくつかのGタンパク質結合レセプターにおいて関連付けられている。さらに、TM5のセリン、TM6のアスパラギン、およびTM6のまたはTM7のフェニルアラニンまたはチロシンはまた、リガンド結合に関連する。

Gタンパク質結合レセプターは、ヘテロ三量体のGタンパク質により種々の細胞内の酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内で結合し得る（Johnsonら、Endoc., Rev., 10:317-331(1989)を参照のこと）。異なるGタンパク質の α サブユニットは、細胞内で種々の生物学的機能を調節するための特定のエフェクターを優先的に刺激する。Gタンパク質結合レセプターの細胞質残基のリン酸化は、いくつかのGタンパク質結合レセプターのGタンパク質結合の調節のための重要な機構として同定されている。

Gタンパク質結合レセプターは、哺乳動物宿主内の多数の部位において見出されている。例えば、ドーパミンは中枢神経系における重要な神経伝達物質であり、そしてGタンパク質結合レセプターのリガンドである。

本発明の1つの局面によれば、Gタンパク質結合レセプターであると推定的に同定されていた新規のポリペプチド、ならびにそれらの生物学的に活性で、かつ診断または治療に有用なフラグメントおよび誘導体が提供される。本発明のポリペプチドはヒト起源である。

本発明の別の局面によれば、ヒトGタンパク質結合レセプターをコードする単離された核酸分子が提供され、この核酸分子は、mRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、

ならびにそれらのアンチセンスアナログ、および生物学的に活性で、かつ診断または治療に有用なそれらのフラグメントを含む。

本発明のさらなる局面によれば、前記タンパク質の発現およびその後の前記タンパク質の回収を促進する条件下で、ヒトGタンパク質結合レセプター核酸配列を含む組換え原核生物宿主細胞および/または組換え真核生物宿主細胞を培養する工程を包含する組換え技術によって、このようなポリペプチドを産生するためのプロセスが提供される。

本発明のなおさらなる局面によれば、このようなポリペプチドに対する抗体が提供される。

別の実施態様によれば、レセプターアンタゴニストおよび/またはアゴニストならびに/あるいはレセプターリガンドについてスクリーニングするためにこのレセプターを用いるプロセスが提供される。

本発明のなお別の実施態様によれば、Gタンパク質結合レセプターの過小発現に関する状態の処置のために、Gタンパク質結合レセプターを刺激する、このようなアゴニストを使用するプロセスが提供される。

本発明の別の局面によれば、Gタンパク質結合レセプターの過剰発現に関する状態を処置するために、Gタンパク質結合レセプターの作用を阻害する、このようなアンタゴニストを用いるプロセスが提供される。

本発明のなお別の局面によれば、本発明のGタンパク質結合レセプターポリペプチドがGタンパク質結合レセプターのリガンドを結合し得るような、Gタンパク質結合レセプターの少なくとも1つの膜貫通ドメインの、フラグメント、コンセンサスフラグメント、および/または保存されたアミノ酸置換を有する配列である、あるいはGタンパク質レセプターのリガンド結合を、量的にまたは質的に調節もし得る非天然、合成、単離、および/または組換えGタンパク質レセプターが提供される。

本発明のなお別の局面によれば、合成または組換えGタンパク質結合レセプターポリペプチド、それらの保存的置換体および誘導体、抗体、抗イディオタイプ抗体、それらの予期される生物学的特性により、リガンドとの結合によるかまた

はリガンド結合を調節することによってGタンパク質結合レセプター機能の潜在的なモジュレーターとして有用であり得る組成物および方法が提供され、これらは診断、治療、および/または研究応用に使用され得る。

本発明のなお別の目的は、レセプタータイプおよびサブタイプとして、種々のGタンパク質レセプターまたはそれらのフラグメントを阻害または模倣するように設計された、合成、単離または組換えポリペプチドを提供することである。

本発明のなおさらなる局面によれば、Gタンパク質結合レセプター核酸配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの核酸分子を含有する診断プローブも提供される。

本発明のなお別の目的によれば、Gタンパク質結合レセプター核酸配列中の変異に関連する疾患または疾患に対する罹患性を検出するための診断アッセイが提供される。

本発明のこれらおよび他の局面は、本明細書中の教示から当業者に明らかであるはずである。

以下の図面は、本発明の実施態様の例示であり、そして請求の範囲により包囲されるような本発明の範囲を限定することを意味しない。

図1～4は、それぞれ、本発明の4つのGタンパク質結合レセプターのcDNA配列、および対応する推定アミノ酸配列を示す。アミノ酸の標準1文字略語を使用する。配列決定を、373自動DNAシーケンサー (Applied Biosystems, Inc.) を用いて行った。配列決定の精度は、97%精度より大きいと予想される。

図5は、GPR1 (上の行) と臭気物質レセプター様タンパク質 (下の行) との間のアミノ酸相同性の例示である。

図6は、GPR2 (上の行) とヒト内皮分化遺伝子-1 (human Endothelial Differentiation Gene-1) (EDG-1) (下の行) との間のアミノ酸相同性の例示である。

。

図7は、GPR3 (上の行) とヒトGタンパク質結合レセプターオープンリーディングフレーム (ORF) (下の行) との間のアミノ酸相同性の例示である。

図8は、GPR4とニワトリオーファン (orphan) Gタンパク質結合レセプター (

下の行) との間のアミノ酸相同性の例示である。

本発明の1つの局面によれば、図1～4の推定のアミノ酸配列(配列番号2、4、6および8)を有する成熟ポリペプチド、または1994年12月16日にATCC受託番号第75981号(GPR1)、第75983号(GPR2)、第75976号(GPR3)、第75979号(GPR4)として寄託されたクローンのcDNAによりコードされる成熟ポリペプチド

をコードする単離された核酸(ポリヌクレオチド)が提供される。

本発明のGPR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト胸部から単離され得る。GPR1をコードするポリヌクレオチドは、ヒト8週齢胚由来のcDNAライブラリーで発見された。これは構造的にGタンパク質結合レセプターファミリーに関連する。これは、296アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。このタンパク質は、臭気物質レセプター様タンパク質に最も高い程度の相同性を示し、216アミノ酸の領域にわたって66%の同一性および83%の類似性を有する。

本発明のGPR2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト肝臓、心臓、および白血球から単離され得る。GPR2をコードするポリヌクレオチドは、ヒト副腎腫瘍由来のcDNAライブラリーで発見された。これは構造的にGタンパク質結合レセプターファミリーに関連する。これは、393アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。このタンパク質は、ヒトEDG-1に最も高い程度の相同性を示し、383アミノ酸の領域にわたって30%の同一性および52%の類似性を有する。GPR2に対する潜在的なリガンドとしては、アナンダミド、セロトニン、アドレナリン、およびノルアドレナリンが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明のGPR3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト肝臓、腎臓、および脾臓から単離され得る。GPR3をコードするポリヌクレオチドは、ヒト好中球由来のcDNAライブラリーで発見された。これは構造的にGタンパク質結合レセプターファミリーに関連する。これは、293アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。このタンパク質は、ヒトGタンパク質結合レセプターオープンリーディングフレームに最も高い程度の相同性を示

し、アミノ酸配列全体にわたって39%の同一性および61%の類似性を有する。GPR3に対する潜在的なリガンドとしては、血小板活性化因子、トロンビン、C5a、およびブラジキニンが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明のGPR4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト心臓、脾臓、および白血球から単離され得る。GPR4をコードするポリヌクレオチドは、ヒト12週齢胚由来のcDNAライブラリーで発見された。これは構造的にGタンパク質結合

レセプターファミリーに関連する。これは、344アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。このタンパク質は、ニワトリオーファンGタンパク質結合レセプターに最も高い程度の相同性を示し、291アミノ酸の領域にわたって82%の同一性および91%の類似性を有する。GPR4に対する潜在的なリガンドとしては、トロンビン、ケモカイン、および血小板活性化因子が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態またはDNA（このDNAは、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含む）の形態であり得る。DNAは二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖の場合には、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、図1～4（配列番号1、3、5および7）に示すコード配列または寄託したクローンのコード配列と同一であり得るか、あるいはそのコード配列が、遺伝コードの重複または縮重の結果として、図1～4（配列番号1、3、5および7）のDNAまたは寄託したcDNAと同じ成熟ポリペプチドをコードする異なるコード配列であり得る。

図1～4（配列番号2、4、6および8）の成熟ポリペプチドまたは寄託したcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、以下を含み得る：成熟ポリペプチドのコード配列のみ；成熟ポリペプチドのコード配列（および必要に応じてさらなるコード配列）および非コード配列（例えば、イントロンあるいは成熟ポリペプチドのコード配列の5'および/または3'非コード配列）。

従って、用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、ポリペプチ

ドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを含む。

本発明はさらに、図1～4（配列番号2、4、および68）の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドまたは寄託したクローンのcDNAによりコードされるポリペプチドのフラグメント、アナログ、および誘導体をコードする本明細書中上記のポリヌクレオチドの改変体に関する。ポリヌクレオチドの改変体は、ポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子改変体またはポリヌクレオチドの天然に存在しない改変体であり得る。

従って、本発明は、図1～4（配列番号2、4、6および8）に示すものと同じ成熟ポリペプチド、または寄託したクローンのcDNAによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドの改変体を含む。この改変体は、図1～4（配列番号2、4、6および8）のポリペプチドまたは寄託したクローンのcDNAによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログをコードする。このようなヌクレオチド改変体は、欠失改変体、置換改変体、および付加または挿入改変体を含む。

本明細書中上記で示したように、ポリヌクレオチドは、図1～4（配列番号1、3、5および7）に示すコード配列または寄託したクローンのコード配列の天然に存在する対立遺伝子改変体であるコード配列を有し得る。当該分野で公知なように、対立遺伝子改変体は、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有し得るポリヌクレオチド配列の別の形態であり、これはコードされるポリペプチドの機能を実質的に変化させない。

本発明のポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列にインフレームで融合されたコード配列を有し得る。マーカー配列は、細菌宿主の場合には、マーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供する、pQE-9ベクターにより供給されるヘキサヒスチンタグであり得る。あるいは、例えばマーカー配列は、哺乳動物宿主（例えば、COS-7細胞）が使用される場合は、赤血球凝集素（HA）タグであり得る。HAタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエпитープと一致する（Wilson, I.ら、Cell, 37

:767(1984))。

本発明はさらに、配列間に少なくとも50%、好ましくは70%の同一性が存在する場合、本明細書中上記の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本発明は特に、本明細書中上記のポリヌクレオチドにストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で用いられる用語「ストリンジントな条件」は、ハイブリダイゼーションが、配列間に少なくとも95%、そして好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合のみに生じることの意味する。好ましい実施態様において、本明細書中上記のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、図1～4（配列番号1、3、5 お

よび7）のcDNAまたは寄託したcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性のいずれかを保持する（すなわち、Gタンパク質結合レセプターとして機能するか、またはポリペプチドはGタンパク質結合レセプターとして機能しないが、レセプターに対してリガンドを結合する能力を保持する）ポリペプチドをコードする（例えば、レセプターの可溶形態）。

あるいは、このポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズし、本明細書中上記したように、それに対して同一性を有し、そして活性を保持していない、少なくとも20塩基、好ましくは30塩基、そしてより好ましくは少なくとも50塩基を有するポリヌクレオチドであり得る。そのようなポリヌクレオチドは、配列番号1のポリヌクレオチドのための、例えばこのポリヌクレオチドの回収のための、プローブ、または診断プローブ、またはPCRプライマーとして用いられ得る。

本明細書中でいう寄託物（単数または複数）は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の下に維持される。これらの寄託物は、当業者に対する便宜として提供されるにすぎず、そして米国特許法第112条の下で寄託が必要とされることを認めたわけではない。寄託物に含まれるポリヌクレオチドの配列、ならびにそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書中に参考として援用され、そして本明細書中の配列の任意の記載とのい

かなる矛盾も抑えている。寄託物を製造し、使用し、または販売するためには実施許諾が必要とされ得、そしてそのような実施許諾はこれによって与えられるわけではない。

本発明はさらに、図1～4（配列番号2、4、6および8）の推定のアミノ酸配列を有するか、または寄託したcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するGタンパク質結合レセプターポリペプチド、ならびにそのようなポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体に関する。

用語「フラグメント」、「誘導体」、および「アナログ」は、図1～4（配列番号2、4、6および8）のポリペプチドまたは寄託したcDNAにコードされるポリペプチドをいう場合、そのようなポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性（すなわち、Gタンパク質結合レセプターとしての機能）を保持するか、

あるいは、ポリペプチドがGタンパク質結合レセプター（例えば、このレセプターの可溶型）として機能しないとしても、リガンドまたはレセプターに結合する能力を保持するか、のいずれかであるポリペプチドを意味する。アナログは、プロタンパク質部分の切断により活性化されて活性な成熟ポリペプチドを生成し得るプロタンパク質を含む。

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然のポリペプチドまたは合成ポリペプチドであり得、好ましくは組換えポリペプチドであり得る。

図1～4（配列番号2、4、6および8）のポリペプチドまたは寄託したcDNAによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体、またはアナログは、(i) 1つ以上のアミノ酸残基が保存アミノ酸残基または非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）で置換され、そしてこのような置換されるアミノ酸残基は遺伝的コードによりコードされ得るアミノ酸残基であってもよく、またはそうでなくてもよいもの、あるいは(ii) 1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含有するもの、あるいは(iii) 成熟ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）のような別の化合物と融合されているもの、あるいは(iv) その中にさらなるアミノ酸が、成熟ポリペプチドの精

製のために使用される成熟ポリペプチドに融合されているものであり得る。このようなフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内にあると考えられる。

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは、単離された形態で提供され、そして好ましくは均質に精製される。

用語「単離された」は、物質がその本来の環境（例えば、天然に存在する場合は、天然の環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物の中に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然の系において共存する物質の幾らかまたは全てから分離されている同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドはバクテリアの一部であり得、そして／またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であり得、そしてそのようなバクテリアまたは組成物はその天然の環境の一部ではないため、なお単離され

得る。

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むバクテリア、本発明のバクテリアを用いて遺伝子操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。

宿主細胞は、本発明のバクテリア（これは、例えば、クローニングバクテリアまたは発現バクテリアであり得る）を用いて遺伝子操作される（形質導入されるか、または形質転換されるか、またはトランスフェクトされみ）。バクテリアは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化するか、形質転換体を選択するか、またはGタンパク質結合レセプター遺伝子を増幅するために適切に改変した従来の栄養培地中において培養され得る。培養条件（例えば、温度、pHなど）は、発現のために選択される宿主細胞に以前使用された条件であり、そして当業者には明らかである。

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によりポリペプチドを産生するために用いられ得る。従って、例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現す

るための種々の発現ベクターのいずれか1つに含まれ得る。このようなベクターは、染色体DNA配列、非染色体DNA配列、および合成DNA配列を包含する。このようなベクターは、例えば、SV40の誘導体；細菌性プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ウイルスDNA（例えば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病）である。しかし、宿主において複製可能で、かつ存続可能である限り、他の任意のベクターも使用され得る。

適切なDNA配列は、種々の手順によりベクターに挿入され得る。一般に、DNA配列は、当該分野で公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順および他の手順は、当業者の範囲内であると考えられる。

発現ベクター中のDNA配列は、適切な発現制御配列（プロモーター）に作動可能に連結され、mRNAの合成を指示する。このようなプロモーターの代表的な例としては、以下が挙げられ得る：LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lacまたはtrp、λファージP_Lプロモーター、および原核生物細胞または真核生物細胞あるいはそのウイルス内で遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーター。

発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有する。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含有し得る。

さらに、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型特性（例えば、真核細胞培養物についてはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、あるいは例えばE. coliにおけるテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性）を提供する1つ以上の選択マーカー遺伝子を含有する。

本明細書中上記のような適切なDNA配列ならびに適切なプロモーター配列または制御配列を含有するベクターは、適切な宿主を形質転換して宿主にタンパク質を発現させるために用いられ得る。

適切な宿主の代表的な例としては、以下が挙げられ得る：細菌細胞（例えば、E. coli、Streptomyces、Salmonella typhimurium）；真菌細胞（例えば酵母）；昆虫細胞（例えば、Drosophila S2およびSpodoptera Sf9）；動物細胞（例えば

、CHO、COSまたはBowes黒色腫)；アデノウイルス；植物細胞など。適切な宿主の選択は、本明細書中の教示から当業者の範囲内であると考えられる。

さらに詳細には、本発明はまた、上記で広範に記載した1つ以上の配列を含む組換え構築物を包含する。構築物は、ベクター（例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクター）を包含し、このベクターの中に、本発明の配列が正方向または逆方向に挿入されている。この実施態様の好ましい局面において、構築物はさらに、配列に作動可能に連結された調節配列（例えば、プロモーターを包含する）を含む。非常に多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者には公知であり、そして購入可能である。以下のベクターが例として提供される。細菌性：pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pbs、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene)；pTRC99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)。真核性：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)；pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia)。しかし、他の任意のプラスミドまたはベクターも、それらが宿主において複製可能で、かつ存続可能である限り、使用され得る。

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベク

ターまたは選択マーカーを有する他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特によく知られた細菌性プロモーターは、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P_R、P_Lおよびtrpを包含する。真核生物プロモーターは、CMV即時型、HSVチミジンキナーゼ、初期SV40および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネインIを包含する。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベル内である。

さらなる実施態様では、本発明は上記の構築物を含有する宿主細胞に関する。宿主細胞は、高等真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞）または下等真核生物細胞（例えば、酵母細胞）であり得るか、あるいは宿主細胞は原核生物細胞（例えば、細菌細胞）であり得る。構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエ

レクトロポレーションにより達成され得る(Davis,L., Dibner,M., Battey,I., Basic Methods in Molecular Biology,(1986))。

宿主細胞中の構築物を用いて、従来の方法で組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生し得る。あるいは、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成的に産生され得る。

成熟タンパク質は、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞中で適切なプロモーターの制御下で発現され得る。無細胞翻訳系もまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、このようなタンパク質を産生するために用いられ得る。原核生物宿主および真核生物宿主で使用される適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor,N.Y., (1989) (この開示は、本明細書中に参考として援用される)に記載されている。

本発明のポリペプチドをコードするDNAの高等真核生物による転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増大される。エンハンサーはDNAのシス作用エレメントであり、通常は約10~約300bpであり、これはプロモーターに作用してその転写を増大させる。例として、複製起点のbp100~270の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製

起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能とする複製起点および選択マーカー (例えば、*E.coli*のアンピシリン耐性遺伝子および*S.cerevisiae*のTRP1遺伝子)、ならびに下流の構造配列の転写を指示する高発現遺伝子由来のプロモーターを含有する。このようなプロモーターは、中でも解糖酵素 (例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK))、 α 因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質などをコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始配列および翻訳終止配列と適切な相内で組立てられる。必要に応じて、異種配列は、所望の特徴 (例えば、発現された組換え産物の安定化または簡略化された精製) を与えるN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコード

し得る。

細菌の使用に有用な発現ベクターは、機能的なプロモーターと作動可能な読み取り相で、適切な翻訳開始シグナルおよび翻訳終止シグナルと共に所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を挿入することにより構築される。ベクターは、1つ以上の表現型選択マーカー、およびベクターの維持を確実にし、かつ所望される場合は宿主内での増幅を提供するための複製起点を含有する。形質転換のために適切な原核生物宿主は、E.coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、ならびに Pseudomonas 属、Streptomyces 属、および Staphylococcus 属内の種々の種を包含するが、他の種もまた選択対象として用いられ得る。

代表的な、しかし限定しない例として、細菌の使用に有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクター pBR322 (ATCC 37017) の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミドに由来する選択マーカーおよび細菌性の複製起点を含有し得る。このような市販のベクターは、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) および GBM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) を含む。これらの pBR322 「骨格」 部分は、適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わされる。

適切な宿主株の形質転換および適切な細胞密度までの宿主株の増殖に続いて、選択されたプロモーターは適切な手段（例えば、温度シフトまたは化学的誘導）

により誘導され、そして細胞はさらなる期間培養される。

細胞は、代表的には遠心分離により収集され、物理的手段または化学的手段により破砕され、そして得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。

タンパク質の発現において用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破砕、または細胞溶解剤の使用を包含する任意の便利な方法により破砕され得る。このような方法は当業者に周知である。

種々の哺乳動物細胞の培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために用いられ得る。哺乳動物発現系の例には、Gluzman, Cell, 23: 175 (1981) に記載されるサル腎臓線維芽細胞の COS-7 株、および適合性のベクターを発現し得る他の細胞株（例えば、C127、3T3、CHO、HeLa、および BHK 細胞株）が含まれる。哺乳動

物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプター部位、転写終結配列、および5'フランキンゲン非転写配列をまた含有する。SV40スプライス部位、およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列は、必要な非転写遺伝的エレメントを提供するために使用され得る。

Gタンパク質結合レセプターポリペプチドは、以下を含む方法により組換え細胞培養物から回収され、そして精製され得る。硫酸沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィー。必要に応じて、タンパク質の再折りたたみ(refolding)工程が、成熟タンパク質の配置を完全にするために使用され得る。最終的に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が、最終的な精製工程に用いられ得る。

本発明のポリペプチドは、天然の精製された産物、または化学合成手順の産物であり得るか、あるいは原核生物宿主または真核生物宿主(例えば、培養物中の細菌、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞)から組換え技術により産生され得る。組換え産生手順に用いられる宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化され得るか、またはグリコシル化されないかもしれない。本発

明のポリペプチドはまた、最初のメチオニンアミノ酸残基を含み得る。

全長Gタンパク質結合レセプター遺伝子のフラグメントは、全長遺伝子を単離し、そしてこの遺伝子に対して高い配列類似性または類似した生物学的活性を有する他の遺伝子を単離するために、cDNAライブラリーのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このタイプのプローブは、一般に少なくとも20塩基を有する。しかし、好ましくは、プローブは少なくとも30塩基を有し、そして例えば、50塩基以上を有し得る。多くの場合、プローブは20~50塩基を有する。プローブはまた、全長の転写物に対応するcDNAクローンおよびゲノムクローン、または調節およびプロモーター領域、エキソン、ならびにイントロンを含む完全

Gタンパク質結合レセプター遺伝子を含むクローンを同定するために使用され得る。スクリーニングの例として、既知のDNA配列を使用し、オリゴヌクレオチドプローブを合成することにより、Gタンパク質結合レセプター遺伝子のコード領域を単離することを含む。本発明の遺伝子の配列と配列相補性を有する標識されたオリゴヌクレオチドは、ヒトcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングするために使用され、ライブラリーのどのメンバーがプローブとハイブリダイズするかを決定する。

本発明のGタンパク質結合レセプターは、レセプターのアンタゴニストおよび/またはアゴニストのスクリーニングのためのプロセスにおいて使用され得る。

一般的に、このようなスクリーニング手順は、その表面でレセプターを発現する適切な細胞を提供することを含む。このような細胞は、哺乳動物、酵母、*Drosophila*、または*E. coli*由来の細胞を含む。特に、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドは、細胞をトランスフェクトし、それにより、それぞれのGタンパク質結合レセプターを発現させるのに用いられる。次いで発現させたレセプターを、試験化合物と接触させ、結合、機能的応答の刺激または阻害を観察する。

1つのこのようなスクリーニング手順は、本発明のそれぞれのGタンパク質結合レセプターを発現するためにトランスフェクトされるメラニン保有細胞の使用を含む。このようなスクリーニング技術は、PCT WO 92/01810 (1992年2月6日公開)に記載されている。

従って、例えば、このようなアッセイは、レセプターリガンドおよびスクリーニングされるべき化合物の両方と、Gタンパク質結合レセプターをコードするメラニン保有細胞とを接触させることにより、レセプターアンタゴニストをスクリーニングするために使用され得る。リガンドにより生じるシグナルの阻害は、化合物がこのレセプターの潜在的なアンタゴニストであること、すなわち、レセプターの活性化を阻害することを示す。

このスクリーニングは、このような細胞とスクリーニングされる化合物とを接触させ、そしてそのような化合物がシグナルを生じるか、すなわち、このような

化合物がレセプターを活性化するかを決定することによりアゴニストを決定するために用いられ得る。

他のスクリーニング技術は、例えば、Science、246巻、181~296頁（1989年10月）に記載されるように、レセプターの活性化により引き起こされる細胞外のpH変化を測定する系において、Gタンパク質結合レセプターを発現する細胞（例えば、トランスフェクトCHO細胞）の使用を含む。例えば、潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストは、Gタンパク質結合レセプターを発現する細胞と接触され得、そしてセカンドメッセンジャー応答（例えば、シグナル伝達またはpH変化）は、潜在的アゴニストまたはアンタゴニストが有効であるか否かを決定するために測定され得る。

別のこのようなスクリーニング技術は、Gタンパク質結合レセプターをコードするRNAをXenopus卵母細胞に導入し、一時的にレセプターを発現させることを含む。次いでそのレセプター卵母細胞は、アンタゴニストをスクリーニングする場合にはレセプターリガンドおよびスクリーニングされる化合物と接触され得、続いて、カルシウムシグナルの阻害の検出が行われる。

別のスクリーニング技術は、そのレセプターがホスホリパーゼCまたはDと連結しているGタンパク質結合レセプターの発現を包含する。このような細胞の代表例としては、内皮細胞、平滑筋細胞、胎児腎細胞などが挙げられ得る。アンタゴニストまたはアゴニストのスクリーニングは、本明細書中上記のように、レセプターの活性化またはホスホリパーゼの2次シグナルによるレセプターの活性化の阻害の検出により達成され得る。

別の方法は、細胞表面にレセプターを有する細胞への標識リガンドの結合の阻害を決定することによる、アンタゴニストのスクリーニングを含む。このような方法は、細胞がその表面にレセプターを発現するようにGタンパク質結合レセプターをコードするDNAで真核細胞をトランスフェクトする工程、および標識形態の公知のリガンドの存在下で細胞と潜在的なアンタゴニストとを接触させる工程を含む。リガンドは、例えば、放射活性により標識され得る。標識リガンドがレセプターに結合する量は、例えば、レセプターの放射活性の測定により測定され

る。レセプターに結合する標識リガンドの減少により決定されるように潜在的なアンタゴニストがレセプターに結合する場合、標識リガンドのレセプターへの結合は阻害される。

Gタンパク質結合レセプターは、哺乳動物宿主において遍在性であり、そして多くの病的な状態を含む、多くの生物学的機能を担う。従って、Gタンパク質結合レセプターを阻害することが所望される場合、一方でGタンパク質結合レセプターを刺激し、そして他方でGタンパク質結合レセプターをアンタゴナイズし得る化合物および薬物を見出すことが望ましい。

例えば、Gタンパク質結合レセプターに対するアゴニストは、治療目的（例えば、喘息、パーキンソン病、急性心不全、低血圧、尿停留（urinary retention）、および骨粗鬆症の治療）に用いられ得る。

一般に、Gタンパク質結合レセプターに対するアンタゴニストは、種々の治療目的（例えば、高血圧、狭心症、心筋梗塞、潰瘍、喘息、アレルギー、良性前立腺肥大、ならびに精神病および神経性疾患（精神分裂病、躁病性興奮、うつ病、譫妄またはハンチントン舞踏病またはGilles dila Tourett症候群のような重篤な精神遅滞、ジスキネジーなどを含む）の処置）に用いられ得る。Gタンパク質結合レセプターアンタゴニストはまた、内因性食欲不振を逆転することおよび過食症の制御において有用である。

Gタンパク質結合レセプターアンタゴニストの例は、抗体、またはいくつかの場合には、Gタンパク質結合レセプターに結合するが、Gタンパク質結合レセプターの活性を阻害するようなセカンドメッセンジャー応答を惹起しないオリゴヌクレオチドを含む。抗体は、一般に抗体の抗原結合部位に会合する独特の決定基

を認識する抗イディオタイプ抗体を包含する。潜在的なアンタゴニストもまた、Gタンパク質結合レセプターのリガンドに密接に関連するタンパク質、すなわち、リガンドのフラグメントを含み、これは生物学的機能を欠失しており、そしてGタンパク質結合レセプターに結合するときに応答を惹起しない。

潜在的なアンタゴニストはまた、アンチセンス技術の使用によって調製されたアンチセンス構築物を含む。アンチセンス技術は、三重らせん形成もしくはアン

チセンスDNAまたはRNAを介した遺伝子発現を制御するた菊に用いられ得、これらの方法の両方は、ポリヌクレオチドがDNAまたはRNAに結合することに基づいている。例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、長さが約10~40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために用いられる。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的に設計され(三重らせん-Leeら、Nuc1. Acids Res., 6:3073(1979); Cooneyら、Science, 241:456(1988);およびDervanら、Science, 251: 1360(1991)を参照のこと)、それにより、転写およびGタンパク質結合レセプターの産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のGタンパク質結合レセプターへの翻訳をブロックする(アンチセンス-Okano、J. Neurochem., 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988))。上記のオリゴヌクレオチドはまた、細胞に送達され得、それによって、アンチセンスRNAまたはDNAが、Gタンパク質結合レセプターの産生を阻害するためにインビボで発現され得る。

別の潜在的なアンタゴニストは、Gタンパク質結合レセプターに結合する小分子である。これは、正常な生物学的活性が妨げられるようにリガンドへの接近を不可能にする。小分子の例は、小ペプチドまたはペプチド様分子を含むが、これらに限定されない。

潜在的なアンタゴニストはまた、可溶形態のGタンパク質結合レセプター(例えば、このレセプターのフラグメント)を含む。これはリガンドに結合し、そしてこのリガンドが膜結合Gタンパク質結合レセプターと相互作用することを妨げる。

本発明は、過剰のGタンパク質結合レセプター活性に関連する異常な状態を処置する方法をさらに提供する。これは、Gタンパク質結合レセプターに対するリガンドの結合をブロックし、それによって異常な状態を軽減するに効果的な量で薬学的に受容可能なキャリアとともに本明細書中上記のようなアンタゴニストを被験体に投与することを含む。

本発明はまた、Gタンパク質結合レセプター活性の過小発現に関連する異常な状態を処置する方法を提供する。これは、上記のアゴニストの治療学的に有効な量を薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、リガンドのGタンパク質結合レセプターへの結合を増大し、それによって異常な状態を軽減するに効果的な量で被験体に投与することを含む。

可溶性形態のGタンパク質結合レセプター、アンタゴニスト、およびアゴニストは、適切な薬学的キャリアと組み合わせて用いられ得る。このような組成物は、治療的有效量のアンタゴニストまたはアゴニスト、および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含む。このようなキャリアとしては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。処方、投与の態様に合わせてべきである。

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の1つまたはそれ以上の成分で満たされた1つ以上の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。このような容器（単数または複数）に関して、薬剤または生物学的製品の製造、使用、または販売を統制する政府機関により規定された形式の製品表示をし得、この製品表示は、ヒトへの投与についての製造、使用、または販売における機関による認可を表す。さらに、薬学的組成物は、他の治療化合物と併用して用いられ得る。

薬学的組成物は、例えば、局所、静脈内、腹膜腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内、または皮内経路による簡便な様式で投与され得る。薬学的組成物は、特異症状の処置および/または予防に有効な量で投与される。一般に、薬学的組成物は少なくとも約 $10\mu\text{g/kg}$ 体重の量で投与され、そして多くの場合、それらは1日に約 8mg/kg 体重を超えない量で投与される。多くの場合、投薬量は、1日に約 $10\mu\text{g/kg}$ 体重から約 1mg/kg 体重であり、投与経路、症状などが考慮される。

Gタンパク質結合レセプターポリペプチド、およびアンタゴニストまたはアゴニスト（これらはポリペプチドである）は、本発明に従って、インビボでのこのようなポリペプチドの発現により用いられ得る。これはしばしば「遺伝子治療」と呼ばれる。

従って、例えば、患者由来の細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)を用いてインビボで操作され得、次いで、操作された細胞はこのポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。このような方法は当該分野で周知である。例えば、細胞は、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子の使用により、当該分野で公知の手順によって操作され得る。

同様に、細胞は、インビボでのポリペプチドの発現のために、例えば、当該分野で公知の手順によりインビボで操作され得る。当該分野で公知のように、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルス粒子を産生するための産生細胞は、インビボで細胞を操作するため、およびインビボでのポリペプチドの発現のために患者に投与され得る。このような方法により本発明のポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示から当業者には明らかなはずである。例えば、細胞を操作するための発現ビヒクルは、レトロウイルス以外のもの(例えば、アデノウイルス)であり得る。これは、適切な送達ビヒクルと組み合わせた後、インビボで細胞を操作するために使用され得る。

本発明はまた、Gタンパク質結合レセプターに結合し得ることが知られていないリガンドが、このようなレセプターに結合し得るかどうかを決定するための方法を提供し、この方法は、Gタンパク質結合レセプターへのリガンドの結合を許容する条件下でGタンパク質結合レセプターを発現する哺乳動物細胞をリガンドと接触させる工程、レセプターに結合するリガンドの存在を検出する工程、およびこれにより、リガンドがGタンパク質結合レセプターに結合するかどうかを決定する工程を包含する。

本発明はさらに、細胞の表面上のヒトGタンパク質結合レセプターと特異的に相互作用し、そして結合する薬物を同定するために薬物をスクリーニングする方

法を提供する。これはGタンパク質結合レセプターをコードする単離されたDNA分子を含有する哺乳動物細胞と複数の薬物とを接触させ、哺乳動物細胞に結合するこれらの薬物を決定し、そしてそれによって本発明のヒトGタンパク質結合レ

セプターと特異的に相互作用し、そして結合する薬物を同定することを包含する。

本発明はまた、Gタンパク質結合レセプターをコードするmRNAの存在を検出することにより、細胞の表面におけるGタンパク質結合レセプターの発現を検出する方法を提供し、この方法は、細胞から全mRNAを獲得すること、および獲得したmRNAを、ヒトGタンパク質結合レセプターをコードする核酸分子の配列に含まれる配列と特異的にハイブリダイズし得る少なくとも15ヌクレオチドの核酸分子を含有する核酸プローブと、ハイブリダイズする条件下で接触させること、プローブにハイブリダイズしたmRNAの存在を検出すること、およびそれによって細胞によるGタンパク質結合レセプターの発現を検出することを包含する。

本発明はまた、Gタンパク質結合レセプター遺伝子中の変異の存在に関連する疾患または疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部としてのGタンパク質結合レセプター遺伝子の使用に関する。例として、このような疾患は、細胞の形質転換（例えば、腫瘍、ガン）に関する。

ヒトGタンパク質結合レセプター遺伝子における変異を有する個体は、種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞（例えば、血液、尿、唾液、組織生検、および剖検物質）より得られ得る。ゲノムDNAは、検出のために直接使用され得るか、または分析前にPCRを用いることにより酵素的に増幅され得る（Saikiら、Nature、324:163-166(1986)）。RNAあるいはcDNAもまた、また同じ目的のために使用され得る。例として、Gタンパク質結合レセプタータンパク質をコードする核酸に相補的なPCRプライマーが、Gタンパク質結合レセプター変異を同定および解析するために使用され得る。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型との比較における増幅された産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、放射性標識されたGタンパク質結合レセプターRNAまたは、あるいは、放射性標識されたGタンパク質結合レセプターアンチセンスDNA配列に、増幅されたDNAをハイブリダイズさせることにより同定され得る。完全に対合した配列は、リボヌクレアーゼA消化または融解温度の差により

誤対合した二重らせんと区別され得る。

対照遺伝子と変異を有する遺伝子との間の配列の相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにされ得る。さらに、クローン化されたDNAセグメントは、特異的なDNAセグメントを検出するためのプローブとして用いられ得る。本発明の感度は、PCRと組み合わせられた場合、非常に増強される。例えば、配列決定プライマーは、二本鎖PCR産物または改変されたPCRによって作製された一本鎖テンプレート分子を用いて使用される。配列決定は、放射性標識ヌクレオチドを用いる従来の手順または蛍光タグを用いる自動配列決定手順によって実施される。

DNA配列の差異に基づいた遺伝子試験は、変性剤を含むかまたは含まないゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動的移動度における変化の検出により達成され得る。小さな配列欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動によって視覚化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、変性ホルムアミド勾配ゲルにおいて区別され得る。ここで異なるDNAフラグメントの移動度は、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って異なる位置にゲル内で遅延される（例えば、Myersら、Science, 230:1242(1985)を参照のこと）。

特定の位置での配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNase保護およびS1保護または化学的切断法（例えば、Cottonら、PNAS, USA, 85:4397-4401(1985)））により明らかにされ得る。

従って、特定のDNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学的切断、直接的なDNA配列決定、または制限酵素の使用（例えば、制限断片長多型(RFLP)）およびゲノムDNAのサザンブロッティングのような方法によって達成され得る。

より慣習的なゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はまたインサイチュ分析により検出され得る。

本発明の配列はまた、染色体の同定に有益である。この配列は、個々のヒト染色体の特定の位置を特異的に標的化し、そしてその位置にハイブリダイズし得る。さらに、現在は染色体上の特定の部位を同定する必要がある。現在、染色体位置の標識に利用可能な実際の配列データ（反復多型）に基づいた染色体標識試薬はほとんどない。本発明に従うDNAの染色体へのマッピングは、これらの配列と

疾

患に関する遺伝子とを相関させることにおける重要な第1段階である。

簡潔に述べれば、配列は、cDNAからPCRプライマー（好ましくは15～25bp）を調製することにより染色体にマップされ得る。3'非翻訳領域のコンピューター解析が、ゲノムDNA内で「より多いエキソンにまたがらない、従って増幅プロセスを複雑化するプライマーを迅速に選択するために使用される。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用される。プライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅フラグメントを生じる。

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーを用いる本発明を使用して、特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは類似の様式の大きなゲノムクロンのプールを用いて部分的局在性の決定(sublocalization)が達成され得る。染色体にマップするために同様に使用され得る他のマッピング計画は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識化フロー選別した(flow-sorted)染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択を包含する。

cDNAクロンの中期染色体スプレッドへの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)は、1工程で正確な染色体位置を提供するために使用され得る。この技術は、500または600塩基という短いcDNAで使用され得る；しかし、2,000bpよりも大きなクロンは、単純な検出に十分なシグナル強度をとまって独特の染色体位置に結合するより高い可能性を有する。FISHは、ESTが由来したクロンの使用を必要とし、そしてより長い配列が好ましい。例えば、2,000bpが良好であり、4,000がより良好であり、そして4,000より大きいものは、時間の合理的な割合で良好な結果をえるためにはおそらく必要ではない。この技術の総説としては、Vermaら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)を参照のこと。

—II.配列が正確な染色体位置にマップされると、配列の染色体上での物理的な

位置を遺伝的地図のデータと相関させられ得る。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man に見出される (Johns Hopkins Uni-

versity Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能である)。次いで、同一の染色体領域にマップされる遺伝子と疾患との関係が、連鎖解析 (物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝) により同定される。

次に、罹患個体と非罹患個体との間のcDNA配列またはゲノム配列の差異を決定する必要がある。変異がいくつかまたはすべての罹患個体に観察されるがいずれの正常な個体にも観察されない場合、この変異は疾患の原因因子であるようである。

物理的マッピング技術および遺伝的マッピング技術の現在の解像度では、疾患に関連する染色体領域に正確に位置決めされたcDNAは、50と500との間の潜在的な原因遺伝子の1つであり得る。(これは、1メガベースのマッピング解像度で、そして20kbあたり1遺伝子と仮定する。)

このポリペプチド、そのフラグメントまたは他の誘導体、またはそれらのアナログ、あるいはそれらを発現する細胞は、それらに対する抗体を産生させるための免疫原として使用され得る。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体であり得る。本発明はまた、キメラ抗体、単鎖抗体およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメント、またはFab発現ライブラリーの産物を包含する。当該分野で公知の種々の手順が、このような抗体およびフラグメントの産生のために使用され得る。

本発明の配列に対応するポリペプチドに対して生成される抗体は、動物へのポリペプチドの直接注射により、または動物へのポリペプチドの投与により得られ得る。この動物は、好ましくは非ヒトである。次いで、このようにして得られた抗体は、ポリペプチド自体に結合する。このようにして、ポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも、天然のポリペプチド全体に結合する抗体を生成するために使用され得る。次いで、このような抗体は、そのポリペプチドを発現する組織からポリペプチドを単離するために使用され得る。

モノクローナル抗体の調製のために、細胞株の連続培養により産生される抗体

を提供する任意の技術が使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein, 1975, Nature, 256: 495-497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1983, Immunology Today 4: 72)、およびヒトモ

ノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)が挙げられる。

単鎖抗体を産生するために記載された技術(米国特許第4,946,778号)を、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対する単鎖抗体を生成するために適合させ得る。また、トランスジェニックマウスが、本発明の免疫原性のポリペプチド産物に対するヒト化抗体の発現に使用され得る。

本発明を以下の実施例を参照にしてさらに記載する；しかし、本発明はこのような実施例に限定されないことが理解されるべきである。すべての部分または量は、他に明記しない限り重量基準である。

以下の実施例の理解を容易にするために、頻繁に現れる特定の方法および／または用語が記載される。

「プラスミド」は、小文字のpの前および／またはそれに続く大文字および／または数字を示すことにより明示される。本明細書中の出発プラスミドは、市販であり、制限無く公的に入手可能であるか、または公開された手順に従って入手可能なプラスミドから構築され得る。さらに、記載されるプラスミドと等価のプラスミドが当該分野で公知であり、そして当業者には明らかである。

DNAの「消化」は、DNA中の特定の配列でのみ作用する制限酵素でそのDNAを触媒反応的に切断することをいう。本明細書中で使用される種々の制限酵素は、市販されており、そしてそれらの反応条件、補因子、および他の必要条件は当業者に公知のものが使用された。分析目的には、代表的には1 μ gのプラスミドまたはDNAフラグメントには、約2単位の酵素が約20 μ lの緩衝溶液中で使用される。プラスミド構築のためのDNAフラグメントを単離する目的には、代表的には5～50 μ gのDNAが20～250単位の酵素で、より大きな容量中で消化される。特定の制限酵素のための適切な緩衝液および基質量は、製造者により特定される。37℃で約

1時間のインキュベーション時間が通常使用されるが、しかしこれは供給者の説明書に従って変わり得る。消化後、反応物をポリアクリルアミドゲル上で直接電気泳動して所望のフラグメントを単離する。

切断フラグメントのサイズ分離は、Goeddel, D.ら, *Nucleic Acids Res.*, 8:

4

057(1980)により記載された8%ポリアクリルアミドゲルを使用して行われる。

「オリゴヌクレオチド」は、一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは2つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかをいい、これらは化学的に合成され得る。このような合成オリゴヌクレオチドは、5'リン酸を有さず、従ってキナーゼの存在下でリン酸とATPとを添加しなければ別のオリゴヌクレオチドと連結しない。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸化されていないフラグメントに連結する。

「連結」は、2つの二本鎖核酸フラグメントの間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスをいう(Maniatis, Tら、前出、146頁)。他に提供されていなければ、連結は公知の緩衝液および条件で、ほぼ等モル量の連結されるべきDNAフラグメント0.5 μ gあたり10単位のT4 DNAリガーゼ（「リガーゼ」）を用いて達成され得る。

別に記載しない限り、形質転換はGraham, F.およびVan der Eb, A., *Virology*, 52:456-457(1973)の方法に記載のように実施された。

実施例 1

GPR1の細菌発現および精製

GPR1をコードするDNA配列(ATCC受託番号第75981号)を、プロセスされたGタンパク質結合レセプターヌクレオチド配列の5'および3'末端配列(シグナルペプチド配列を除く)およびこの遺伝子に対して3'のベクター配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて最初に増幅する。GPR1ヌクレオチド配列に対応するさらなるヌクレオチドを、それぞれ5'および3'配列に添加する。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、配列5'GACTAAAGCTTAATGAGTAGTGAAATGGTG3'(配列番号9)を有し、これはHindIII制限酵素部位、それに続くプロセスされ

たんぱく質の推定末端アミノ酸から始まる9ヌクレオチドのGたんぱく質結合レセプターコード配列を含む。3'配列、5'GAACCTCTAGACCCTCAGGGTTGTAAATCAG3' (配列番号10) は、XbaI部位に相補的な配列を含み、そして続いてGPR1コード配列の20ヌクレオチドを含む。制限酵素部位は、細菌発現ベクターpQE-9 (Qiagen, Inc. Chatsworth, CA) 上の制限酵素部位に対応する。pQE-9は、抗生物質

耐性(Amp^r)、細菌の複製起点(ori)、IPTG調節可能プロモーターオペレーター(P/O)、リボソーム結合部位(RBS)、6-Hisタグ、および制限酵素部位をコードする。次いで、pQE-9をHindIIIおよびXbaIで消化する。増幅配列をpQE-9に連結し、そしてヒスチジンタグおよびRBSをコードする配列とインフレームで挿入する。次いで、連結混合物を用いて、*E. coli*株 M15/rep 4(Qiagen, Inc.)をSambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)に記載の手順により形質転換する。M15/rep4はプラスミドpREP4の多数のコピーを含有する。これは、lacIリプレッサーを発現し、そしてまたカナマイシン耐性(Kan^r)を付与する。形質転換体をLBプレート上で増殖するそれらの能力により同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、制限酵素分析により確認する。

所望の構築物を含むクローンを、Amp (100 µg/ml) と Kan (25 µg/ml) との両方を補充したLB培地における液体培養で一晩(0/N)増殖させる。0/N培養物を用いて1:100~1:250の比で大規模な培養物に接種する。細胞を、600の光学密度(O.D.₆₀₀)が0.4と0.6との間になるまで増殖させる。次いで、IPTG(「イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド」)を加えて1 mMの最終濃度にする。IPTGは、lacIリプレッサーを不活性化することにより、P/Oを解放(clear)し遺伝子発現の増加を誘導する。細胞をさらに3~4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離により収集する。細胞ペレットをカオトロピック薬剤6 MグアニジンHCl中で可溶化する。明澄化後、可溶性Gたんぱく質結合レセプターを、6-Hisタグを含有するたんぱく質により強く結合し得る条件下で、ニッケルキレートカラム上でのクロマトグラフィーによりこの溶液から精製する(Hochuli, Eら、J. Chromatography 411: 177-184(1984))。GPR1を6 MグアニジンHCl(pH5.0)でカラムか

ら溶出し、そして再生の目的で、3 MグアニジンHCl、100mMリン酸ナトリウム、10mMグルタチオン（還元型）、および2 mMグルタチオン（酸化型）に調整する。この溶液中での12時間のインキュベーションの後、タンパク質を10mMリン酸ナトリウムに対して透析する。

実施例 2

GPR2の細菌発現および精製

GPR2をコードするDNA配列（ATCC受託番号第75982号）を、プロセスされたGPR2コード配列の5'および3'末端配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて最初に増幅する。GPR2コード配列に対応するさらなるヌクレオチドを、それぞれ5'および3'配列に添加する。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、配列5'GACTAAAGCTTAATGAGGCCACATGGCA3'（配列番号11）を有し、これはHindIII制限酵素部位、それに続くプロセスされたタンパク質の推定末端アミノ酸から始まる19ヌクレオチドのGPR2コード配列を含む。3'配列、5'GAAGTCTAGACGAAGTAGCGATCCCCCGG3'（配列番号12）は、XbaI部位に相補的な配列を含み、そして続いてGPR2コード配列の遺伝子の21ヌクレオチドを含む。制限酵素部位は、細菌発現ベクターpQE-9（Qiagen, Inc. Chatsworth, CA）上の制限酵素部位に対応する。pQE-9は、抗生物質耐性（Amp^r）、細菌の複製起点（ori）、IPTG調節可能プロモーターオペレーター（P/O）、リボソーム結合部位（RBS）、6-Hisタグ、および制限酵素部位をコードする。次いで、pQE-9をHindIIIおよびXbaIで消化する。増幅配列をpQE-9に連結し、そしてヒスチジンタグおよびRBSをコードする配列とインフレームで挿入する。次いで、連結混合物を用いて、*E. coli*株 ML5/rep 4（Qiagen, Inc.）をSambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)に記載の手順により形質転換する。ML5/rep4はプラスミドpREP4の多数のコピーを含有する。これは、lacIリプレッサーを発現し、そしてまたカナマイシン耐性（Kan^r）を付与する。形質転換体をLBプレート上で増殖するそれらの能力により同定し、そしてアンピシリン／カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、制限酵素分析により確認する。

所望の構築物を含むクローンを、Amp ($100\mu\text{g/ml}$) と Kan ($25\mu\text{g/ml}$) との両方を補充したLB培地における液体培養で一晩 (O/N) 増殖させる。O/N培養物を用いて1:100~1:250の比で大規模な培養物に接種する。細胞を、600の光学密度 (OD_{600}) が0.4と0.6との間になるまで増殖させる。次いで、IPTG (「イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド」) を加えて1 mMの最終濃度にする。IPTGは、 λ acIリプレッサーを不活性化することにより、P/Oを解放 (clear) し遺伝子発現の

増加を誘導する。細胞をさらに3~4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離により収集する。細胞ペレットをカオトロピック薬剤6 MグアニジンHCl中で可溶化する。明澄化後、可溶化GPR2を、6-Hisタグを含有するタンパク質により強く結合し得る条件下で、ニッケル-キレートカラム上でのクロマトグラフィーによりこの溶液から精製する (Hochuli, Eら, J. Chromatography 411: 177-184(1984))。GPR2を6 MグアニジンHCl (pH5.0) でカラムから溶出し、そして再生の目的で、3 MグアニジンHCl、100mMリン酸ナトリウム、10mMグルタチオン (還元型)、および2 mMグルタチオン (酸化型) に調整する。この溶液中での12時間のイオン交換の後、タンパク質を10mMリン酸ナトリウムに対して透析する。

実施例 3

GPR3の細菌発現および精製

GPR3をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75976号) を、プロセスされたGタンパク質結合レセプター核酸配列の5'および3'末端配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて最初に増幅する。GPR3コード配列に対応するさらなるヌクレオチドを、それぞれ5'および3'配列に添加する。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、配列5' GACTAAAGCTTAATGGCGTCTTCTCTGCT 3' (配列番号13) を有し、これはHindIII制限酵素部位、それに続くプロセスされたタンパク質の推定末端アミノ酸から始まる19ヌクレオチドのGPR3コード配列を含む。3'配列、5' GAAGTTCTAGACTTCACACAGTTGTACTAT 3' (配列番号14) は、XbaI部位に相補的な配列を含み、そして続いてGPR3コード配列の19ヌクレオチドを含む。制限酵素部位は、細菌発現ベクターpQE-9 (Qiagen, Inc. Chatsworth, CA) 上の制限

酵素部位に対応する。pQE-9は、抗生物質耐性 (*Amp^r*)、細菌の複製起点 (*ori*)、IPTG調節可能プロモーターオペレーター (P/O)、リボソーム結合部位 (RBS)、6-Hisタグ、および制限酵素部位をコードする。次いで、pQE-9をXbaIおよびXbaIで消化する。増幅配列をpQE-9に連結し、そしてヒスチジンタグおよびRBSをコードする配列とインフレームで挿入する。次いで、連結混合物を用いて、*E. coli*株 M15/rep 4(Qiagen, Inc.)をSambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)に記載の手順により形質転

換する。M15/rep4はプラスミドpREP4の多数のコピーを含有する。これは、lacIリプレッサーを発現し、そしてまたカナマイシン耐性 (*Kan^r*) を付与する。形質転換体をLBプレート上で増殖するそれらの能力により同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、制限酵素分析により確認する。

所望の構築物を含むクローンを、Amp ($100 \mu\text{g/ml}$) と Kan ($25 \mu\text{g/ml}$) との両方を補充したLB培地における液体培養で一晩 (O/N) 増殖させる。O/N培養物を用いて1:100~1:250の比で大規模な培養物に接種する。細胞を、600の光学密度 (O.D._{600}) が0.4と0.6との間になるまで増殖させる。次いで、IPTG (「イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド」) を加えて1 mMの最終濃度にする。IPTGは、lacIリプレッサーを不活性化することにより、P/Oを解放 (clear) し遺伝子発現の増加を誘導する。細胞をさらに3~4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離により収集する。細胞ペレットをカオトロピック薬剤6 MグアニジンHCl中で可溶化する。明澄化後、可溶性GPR3を、6-Hisタグを含有するタンパク質により強く結合し得る条件下で、ニッケルキレートカラム上でのクロマトグラフィーによりこの溶液から精製する (Hochuli, Eら、J. Chromatography 411: 177-184 (1984))。GPR3を6 MグアニジンHCl (pH5.0) でカラムから溶出し、そして再生の目的で、3 MグアニジンHCl, 100mMリン酸ナトリウム、10mMグルタチオン (還元型)、および2 mMグルタチオン (酸化型) に調整する。この溶液中での12時間のインキュベーションの後、タンパク質を10mMリン酸ナトリウムに対して透析する

。

実施例 4

GPR4の細菌発現および精製

GPR4をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75979号) を、プロセスされたGPR4ヌクレオチド配列の5'および3'末端配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて最初に増幅する。GPR4コード配列に対応するさらなるヌクレオチドを、それぞれ5'および3'配列に添加する。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、配列5'GACTAAAGCTTAATCGTAAGCGTTAACAGC3' (配列番号15) を有し、これはHindIII制限酵素部位、それに続くプロセスされたタンパク質の推定末端ア

ミノ酸から始まる19ヌクレオチドのGPR4コード配列を含む。3'配列、5'GAAGCTTCTAGACTTCAGGCAGCAGATTCATT3' (配列番号16) は、XbaI部位に相補的な配列を含み、そして続いてのGPR4コード配列の20ヌクレオチドを含む。制限酵素部位は、細菌発現ベクターpQE-9 (Qiagen, Inc. Chatsworth, CA) 上の制限酵素部位に対応する。pQE-9は、抗生物質耐性 (Amp^r)、細菌の複製起点 (ori)、IPTG調節可能プロモーターオペレーター (P/O)、リボソーム結合部位 (RBS)、6-Hisタグ、および制限酵素部位をコードする。次いで、pQE-9をHindIIIおよびXbaIで消化する。増幅配列をpQE-9に連結し、そしてヒスチジンタグおよびRBSをコードする配列とインフレームで挿入する。次いで、連結混合物を用いて、*E. coli*株 M15/rep 4 (Qiagen Inc.) を Sambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)に記載の手順により形質転換する。M15/rep4はプラスミドpREP4の多数のコピーを含有する。これは、lacIリプレッサーを発現し、そしてまたカナマイシン耐性 (Kan^r) を付与する。形質転換体をLBプレート上で増殖するそれらの能力により同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、制限酵素分析により確認する。

所望の構築物を含むクローンを、Amp (100 μ g/ml) と Kan (25 μ g/ml) との両方を補充したLB培地における液体培養で一晩 (O/N) 増殖させる。O/N培養物を用いて1:100~1:250の比で大規模な培養物に接種する。細胞を、600の光学密度 (0

.D.⁰⁰⁰) が0.4と0.6との間になるまで増殖させる。次いで、IPTG (「イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド」) を加えて1 mMの最終濃度にする。IPTGは、lacIリプレッサーを不活性化することにより、P/Oを解放 (clear) し遺伝子発現の増加を誘導する。細胞をさらに3～4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離により収集する。細胞ペレットをカオトロピック薬剤6 MグアニジンHCl中で可溶化する。明澄化後、可溶化GPR4を、6-Hisタグを含有するタンパク質により強く結合し得る条件下で、ニッケルキレートカラム上でのクロマトグラフィーによりこの溶液から精製する (Hochuli, Eら、J. Chromatography 411: 177-184 (1984))。GPR4を6 MグアニジンHCl (pH5.0) でカラムから溶出し、そして再生の目的で、3 MグアニジンHCl、100 mMリン酸ナトリウム、10 mMグルタチオン (還元型)、および2 mMグルタチオン (酸化型) に調整する。この溶液中での12時間のインキュベーションの後、タンパク質を10 mMリン酸ナトリウムに対して透析する。

実施例 5

COS細胞における組換えGPR1の発現

プラスミド、GPR1 HAの発現を、ベクターpcDNA1/Amp (Invitrogen) から誘導する。ベクターpcDNA1/Ampは以下を含有する：1) SV40複製起点、2) アンピシリン耐性遺伝子、3) E. coli複製起点、4) ポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアデニル化部位が続くCMVプロモーター。完全なGPR1前駆体、およびその3'末端にインフレームで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化する。それゆえ、組換えタンパク質発現はCMVプロモーター下で支配される。HAタグは、先に記載されたようなインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly, およびR. Lerner, 1984, Cell 37, 767)。標的タンパク質へのHAタグの融合により、HAエピトープを認識する抗体を用いる組換えタンパク質の容易な検出が可能になる。

プラスミド構築ストラテジーを以下に記載する：

GPR1をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75981号) を、2つのプライマーを

用いてPCRにより構築する：5'プライマー5'GTCCAAGCTTCCACCATGAGTAGTGAATG
GTG3' (配列番号17) は、HindIII部位、それに続く開始コドンから始まるGPR1
コード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列5'CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGAC
GTCGTATCGGTAGCAGCGTTGTAAATCAGG3' (配列番号18) は、XhoI部位、翻訳停止コ
ドン、HAタグ、およびGPR1コード配列の最後の15ヌクレオチド (停止コドンは含
まない) に相補的な配列を含む。それゆえ、PCR産物は、HindIII部位、インフレ
ームで融合したHAタグが続くGPR1コード配列、HAタグに隣接する翻訳終結停止コ
ドン、およびXhoI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクター (pcDNAI
/Amp) を、HindIIIおよびXhoI制限酵素により消化し、そして連結する。連結混
合物を、E. coli SURE株 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) に形質
転換し、形質転換培養物をアンピシリン培地プレートに播種し、そして耐性コロ

ニーを選択する。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグ
メントの存在を制限分析で試験する。組換えGPR1の発現のために、COS細胞をDEA
E-DEXTRAN法により発現ベクターでトランスフェクトする (J. Sambrook, E. Fri
tsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring L
aboratory Press, (1989))。GPR1 HAタンパク質の発現を、放射性標識および免
疫沈降法により検出する (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Man
ual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))。細胞を、トランスフェ
クションの2日後、³⁵S-システインで8時間標識する。次いで培養培地を回収し
、そして細胞を界面活性剤 (RIPA緩衝液 (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS、
1% NP-40, 0.5% DOC, 50mM Tris(pH7.5)) で溶解する (Wilson, I.ら、同上3
7:767(1984))。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル
抗体により沈降させる。沈降したタンパク質を15% SDS-PAGEゲル上で分析する
。

実施例 6

COS細胞における組換えGPR2の発現

プラスミド、GPR2 HAを、ベクターpcDNAI/Amp (Invitrogen) から誘導する。
ベクターpcDNAI/Ampは以下を含有する：1) SV40複製起点、2) アンピシリン耐

性遺伝子、3) *E. coli*複製起点、4) ポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアデニル化部位が続くOMVプロモーター。完全なGPR2前駆体、およびその3'末端にインフレームで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化する。それゆえ、組換えタンパク質発現はOMVプロモーター下で支配される。HAタグは、先に記載されたようなインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (I. Wilson, H. Niman, R. Heighen, A. Cherenson, M. Connolly, および R. Lerner, 1984, Cell 37, 767)。標的タンパク質へのHAタグの融合により、HAエピトープを認識する抗体を用いる組換えタンパク質の容易な検出が可能になる。

プラスミド構築ストラテジーを以下に記載する：

GPR2をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75983号) を、2つのプライマーを用いてPCRにより構築する：5'プライマー 5'-GTCCAAGCTTGGCCACCATGGTGGTGGCAC

CTGG 3' (配列番号19) は、HindIII部位、それに続く開始コドンから始まるGPR2コード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列 5'-CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGCAGTGGATCCCCCGTGC 3' (配列番号20) は、XhoI部位、翻訳停止コドン、HAタグ、およびGPR2コード配列の最後の15ヌクレオチド (停止コドンは含まない) に相補的な配列を含む。それゆえ、PCR産物は、HindIII部位、インフレームで融合したHAタグが続くGPR2コード配列、HAタグに隣接する翻訳終結停止コドン、およびXhoI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクター (pcDNA1/Amp) を、HindIIIおよびXhoI制限酵素により消化し、そして連結する。連結混合物を、*E. coli* SURE株 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) に形質転換し、形質転換培養物をアンピシリン培地プレートに播種し、そして耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在を制限分析で試験する。組換えGPR2の発現のために、COS細胞をDEAE-DEXTRAN法により発現ベクターでトランスフェクトする (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))。GPR2 HAタンパク質の発現を、放射性標識および免疫沈降法により検出する (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Man

ual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))。細胞を、トランスフェクションの2日後、 ^{35}S -システインで8時間標識する。次いで培養培地を回収し、そして細胞を界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl、1%NP-40、0.1%SDS、1%NP-40、0.5%DOC、50mM Tris(pH7.5)))で溶解する(Wilson, I.ら、同上37:767(1984))。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体により沈降させる。沈降したタンパク質を15% SDS-PAGEゲル上で分析する。

実施例7

COS細胞におけるGPR3の発現

プラスミド、GPR3 HAを、ベクターpcDNAI/Amp (Invitrogen) から誘導する。ベクターpcDNAI/Ampは以下を含有する：1) SV40複製起点、2) アンピシリン耐性遺伝子、3) E. coli複製起点、4) ポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアダニル化部位が続くCMVプロモーター。完全なGPR3前駆体、およびその

3'末端にインフレイムで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化する。それゆえ、組換えタンパク質発現はCMVプロモーター下で支配される。HAタグは、先に記載されたようなインフレイムエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly, および R. Lerner, 1984, Cell 77, 767)。標的タンパク質へのHAタグの融合により、HAエピトープを認識する抗体を用いる組換えタンパク質の容易な検出が可能になる。

プラスミド構築ストラテジーを以下に記載する：

GPR3をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75976号) を、2つのプライマーを用いてPCRにより構築する：5'プライマー 5'GTCCAAGCTTGCCACCATGAACACCACAGTATG3' (配列番号21) は、HindIII部位、それに続く開始コドンから始まるGPR3コード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列 5'CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATCGGTAGCAAGGGATCCATACAAATGT3' (配列番号22) は、XhoI部位、翻訳停止コドン、HAタグ、およびGPR3コード配列の最後の18ヌクレオチド (停止コドンは含まない) に相補的な配列を含む。それゆえ、PCR産物は、HindIII部位、インフ

レームで融合したHAタグが続くGPR3コード配列、HAタグに隣接する翻訳終結停止コドン、およびXhoI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクター (pcDNAI/Amp) を、HindIIIおよびXhoI制限酵素により消化し、そして連結する。連結混合物を、E. coli SURE株 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) に形質転換し、形質転換培養物をアンピシリン培地プレートに播種し、そして耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在を制限分析で試験する。組換えGPR3の発現のために、COS細胞をD EAE-DEXTRAN法により発現ベクターでトランスフェクトする (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))。GPR3 HAタンパク質の発現を、放射性標識および免疫沈降法により検出する (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))。細胞を、トランスフェクションの2日後、 ^{35}S -システインで8時間標識する。次いで培養培地を回収し、そして細胞を界面活性剤 (RIPA緩衝液 (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% S

DS, 1% NP-40, 0.5% DOC, 50mM Tris(pH7.5))で溶解する (Wilson, I.ら、同上 37:767(1984))。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体により沈降させる。沈降したタンパク質を15% SDS-PAGEゲル上で分析する。

実施例 8

COS細胞における組換えGPR4の発現

プラスミド、GPR4HAを、ベクターpcDNAI/Amp (Invitrogen) から誘導する。ベクターpcDNAI/Ampは以下を含有する：1) SV40複製起点、2) アンピシリン耐性遺伝子、3) E. coli複製起点、4) ポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアデニル化部位が続くCMVプロモーター。完全なGPR4前駆体、およびその3'末端にインフレームで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化する。それゆえ、組換えタンパク質発現はCMVプロモータ下で支配される。HAタグは、先に記載されたようなインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する (I. Wilson, H. Niman

、R. Heighten、A. Cherenson、M. Connolly、およびR. Lerner、1984、Cell 37、767)。標的タンパク質へのHAタグの融合により、HAエピトープを認識する抗体を用いる組換えタンパク質の容易な検出が可能になる。

プラスミド構築ストラテジーを以下に記載する：

GPR4をコードするDNA配列(ATCC受託番号第75979号)を、2つのプライマーを用いてPCRにより構築する：5'プライマー5'-GTCCAAGCTTGCACCATGCTAAGCGTTAACAGC3'(配列番号23)は、HindIII部位、それに続く開始コドンから始まるGPR4コード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列5'-CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGCAGGCAGCAGATTTCATTGTC3'(配列番号24)は、XhoI部位、翻訳停止コドン、HAタグ、およびGPR4コード配列の最後の18ヌクレオチド(停止コドンは含まない)に相補的な配列を含む。それゆえ、PCR産物は、HindIII部位、インフレームで融合したHAタグが続くGPR4コード配列、HAタグに隣接する翻訳終結停止コドン、およびXhoI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクター(pcDNA1/Amp)を、HindIIIおよびXhoI制限酵素により消化し、そして連結する。連結混合物を、E. coli SURE株(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)に

形質転換し、形質転換培養物をアンピシリン培地プレートに播種し、そして耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在を制限分析で試験する。組換えGPR4の発現のために、COS細胞をDEAE-DEXTRAN法により発現ベクターでトランスフェクトする(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989))。GPR4 HAタンパク質の発現を、放射性標識および免疫沈降法により検出する(E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))。細胞を、トランスフェクションの2日後、³⁵S-システインで8時間標識する。次いで培養培地を回収し、そして細胞を界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、1% NP-40、0.5% DOC、50mM Tris(pH7.5)))で溶解する(Wilson, I.ら、同上 37:767(1984))。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体により沈降させる。沈降したタンパク質を15% SDS-PAGEゲル上で分析す

る。

実施例 9

バキュロウイルス発現系を用いるGPR1のクローニングおよび発現

全長のGPR1タンパク質をコードするDNA配列 (ATCC受託番号第75981号) を、この遺伝子の5'および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する:

5'プライマーは、配列 5'CGGGATCCCTCCATGAGTAGTGAAATGCTG3' (配列番号25) を有し、そしてBamHI制限酵素部位 (太字)、それに続く真核細胞における翻訳の開始に効率的なシグナルに類似する4つのヌクレオチド (J. Mol. Biol. 1987, 196, 947-950, Kozak, M.) を含有する。これは、このGPR1遺伝子の最初の18ヌクレオチドのすぐ後ろである (転写の開始コドン「ATG」に下線を付する)。

3'プライマーは、配列 5'CGGGATCCCGCTCAGGGTTGTAAATCAGG3' (配列番号26) を有し、そしてBamHI制限エンドヌクレアーゼの切断部位およびGPR1遺伝子の3'非翻訳配列に相補的な18ヌクレオチドを含む。増幅配列を、市販のキット (「Geneclean」 BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.) を用いて、1%アガロースゲ

ルより単離する。次いで、このフラグメントをエンドヌクレアーゼBamHIで消化し、次いで1%アガロースゲルで再び精製する。このフラグメントを、F2と称する。

ベクターpRG1 (pVL941ベクターの改変体、下記) をバキュロウイルス発現系を用いるGPR1タンパク質の発現のために用いる (総説について、Summers, M.D. およびSmith, G.E. 1987, A manual of methods for baculovirus vectors and in sect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555を参照のこと)。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス (AdNPV) の強いポリヘドリンプロモーター、それに続く制限エンドヌクレアーゼBamHIの認識部位を含む。シミアンウイルス (SV) 40のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために用いる。組換えウイルスを容易に選択するために、E. coli由来のβガラクトシダーゼ遺伝子をポリヘドリンプロモーターと同方向に挿入し、その後ポリヘドリン遺伝子のポリアデニ

ル化シグナルが続く。ポリヘドリン配列を、コトランスフェクト野生型ウイルスDNAの細胞媒介性相同組換えのためにウイルス配列で両端で隣接させる。多くの他のバキュロウイルスベクターが、pRG1の代わりに用いられ得る。例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1である (Luckow, V.A.およびSummers, M.D., *Virology*, 170:31-39)。

プラスミドを制限酵素BamHIで消化し、次いで当該分野で公知の手順により仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化した。次いで、市販のキット (「Geneclean」 BIO 101 Inc., La Jolla, CA) を用いて、DNAを1%アガロースゲルより単離する。このベクターDNAをV2と称する。

フラグメントF2および脱リン酸化プラスミドV2を、T4 DNAリガーゼを用いて連結する。次いで、*E. coli* HB101細胞を形質転換し、そして酵素BamHIを用いて、GPR1遺伝子を有するプラスミド (pBac-GPR1) を含む細菌を同定する。クローニングフラグメントの配列を、DNA配列決定により確認する。

5 μ gのプラスミドpBacGPR1を、リポフェクション法 (Felgnerら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417(1987)) を用いて、1.0 μ gの市販の線状化したバキュロウイルス (「BaculoGold™ baculovirus DNA」, Pharmingen, San Diego

o, CA.) とともにコトランスフェクトする。

1 μ gのBaculoGold™ ウイルスDNAおよび5 μ gのプラスミドpBacGPR1を、50 μ lの血清非含有グレース培地 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) を含むマイクロタイタープレートの無菌ウェル中で混合する。その後、10 μ lのリポフェクションおよび90 μ lのグレース培地を添加し、混合し、そして室温にて15分間インキュベートする。次いで、そのトランスフェクション混合物を、血清非含有グレース培地1mlを有する35mm組織培養プレート内に播種されたSf9昆虫細胞 (ATCC CRL 1711) に滴下する。プレートを、新たに加えられた溶液を混合するために、前後に振盪する。次いでプレートを、27℃で5時間インキュベートする。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎児血清を補充した1mlのグレース昆虫培地を添加する。プレートをインキュベーターに戻し、そして27℃で4日間培養を続ける。

4日後、上清を回収し、そしてSummersおよびSmith（前出）による記載と同様にブラークアッセイを行う。改変法として、青く染色されたブラークの容易な単離を可能にする、「Blue Gal」（Life Technologies Inc., Gaithersburg）を有するアガロースゲルを用いる。（「ブラークアッセイ」の詳細な記述はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburg、で配布される昆虫細胞培養法およびバキュロウイルス学の使用者ガイド（9～10頁）においても見い出され得る）。

ウイルスの連続希釈物を細胞に加えた4日後、青く染色されたブラークをエッペンドルフピペットのチップで拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、 $200\mu\text{l}$ のグレース培地を含むエッペンドルフチューブに再懸濁する。寒天を、手短な遠心分離により除去し、そして組換えバキュロウイルスを含む上清を、35mmディッシュに播種されたSf9細胞に感染するために用いる。4日後、これらの培養ディッシュの上清を回収し、次いで4℃で保存する。

Sf9細胞を、10%熱失活化FBSを補充したグレース培地中で増殖させる。細胞を、感染多重度（MOI）2で組換えバキュロウイルスV-GPR1で感染させる。6時間後、その培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを除いたSF900 II培地（Life Technologies Inc., Gaithersburg）に置き換える。42時間後、 $5\mu\text{Ci}$ の ^{35}S -メチオニンおよび $5\mu\text{Ci}$ の ^{35}S システイン（Amersham）を添加する。細胞を

さらに16時間インキュベートし、その後細胞を遠心分離により収集し、そして標識されたタンパク質をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより可視化する。

本発明の多数の改変および変更は、上記教示を参照して可能であり、従って、添付する請求の範囲内で、本発明は特記した以外の方法で実施され得る。

配列表

(I) 一般的情報:

(i) 出願人: リーら

(ii) 発明の名称: ヒトGタンパク質結合レセプター

(iii) 配列数: 26

(iv) 連絡住所:

(A) 名称: カレラ, バーン, ベイン, ギルフィラン, ケッチ,
スチュワート アンド オルステイン

(B) 番地: ベッカー ファーム ロード 6

(C) 市: ローズランド

(D) 州: ニュージャージー

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 07068

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: 3.5 インチ ディスケット

(B) コンピューター: IBM PS/2

(C) OS: MS-DOS

(D) ソフトウェア: ワードパーフェクト 5.1

(vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日: 同時

(C) 分類:

(vii) 先願データ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(viii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: フェラロ, グレゴリー ディー.

(B) 登録番号: 36,134

(C) 照会/記録番号: 325800-270

(ix) 電話回線情報:

(A) 電話: 201-994-1700

(B) テレファックス: 201-994-1744

Met	Ser	Ser	Glu	Met	Val	Lys	Asn	Gln	Thr	Met	Val	Thr	Glu	Phe
				5					10					15
Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Pro	Arg	Ile	Gln	Met	Leu	Leu
				20					25					30
Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Leu	Phe	Tyr	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn
				35					40					45
Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Leu	Ile	Ser	Leu	Asp	Ser	Arg	Leu	His	Thr
				50					55					60

Pro	Met	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ser	His	Leu	Ala	Val	Val	Asn	Ile	Ala	
				65					70					75	
Tyr	Ala	Cys	Asn	Thr	Val	Pro	Gln	Met	Leu	Val	Asn	Leu	Leu	His	
				80					85					90	
Pro	Ala	Lys	Pro	Ile	Ser	Phe	Ala	Gly	Cys	Met	Thr	Leu	Asp	Phe	
				95					100					105	
Leu	Phe	Leu	Ser	Phe	Ala	His	Thr	Glu	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	
				110					115					120	
Met	Ser	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Val	Ala	Ile	Cys	His	Pro	Leu	Arg	Tyr	
				125					130					135	
Phe	Ile	Ile	Met	Thr	Trp	Lys	Val	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	
				140					145					150	
Ser	Trp	Thr	Cys	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Met	Val	His	Val	Ser	Leu	
				155					160					165	
Ile	Leu	Arg	Leu	Pro	Phe	Cys	Gly	Pro	Arg	Glu	Ile	Asn	His	Phe	
				170					175					180	
Phe	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Asp	Thr	
				185					190					195	
Trp	Leu	Asn	Gln	Val	Val	Ile	Phe	Glu	Ala	Cys	Met	Phe	Ile	Leu	
				200					205					210	
Val	Gly	Pro	Leu	Cys	Leu	Val	Leu	Val	Ser	Tyr	Ser	His	Ile	Leu	
				215					220					225	
Gly	Gly	Ile	Leu	Arg	Ile	Gln	Ser	Gly	Glu	Gly	Arg	Arg	Lys	Ala	
				230					235					240	
Phe	Ser	Thr	Cys	Ser	Ser	His	Leu	Cys	Val	Val	Gly	Leu	Phe	Phe	
				245					250					255	
Gly	Ser	Ala	Ile	Val	Met	Tyr	Met	Ala	Pro	Lys	Ser	Arg	His	Pro	
				260					265					270	
Glu	Glu	Gln	Gln	Lys	Val	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Gln	Phe	Leu	Ser	
				275					280					285	
Thr	Pro	Met	Leu	Lys	Pro	Pro	Asp	Leu	Gln	Pro					
				290					295						

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 2185塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号3:

TCACTATAGG	GCGAATGGG	TACGGGCCCC	CCCTCGAAGT	CGACGGTATC	GATAAGCTTG	60
ATATCGAATT	CGGCAAGAGC	CGGGCTCGGA	GAGGTGACCG	AACCGGGGCT	GCTAGCATAG	120
TTTGATTGGA	TGATGGAGCC	AACACAGGGG	TTGGAGCTGG	TACCGGTGAA	GCTGAGGCTA	180
AAAAGGTTC	TGGAGTAGAC	GATGGAGCCA	TAACTGGAAC	CGGAGTCTGT	GAATGAAGCC	240
AGGACAAGAG	CAGCACCTGG	CGATGGTGCC	AGGACTGGAA	GAGGAGCCAG	AGGAAGAGCT	300
GGAGAAAGAG	CCAGAATTGC	TGTCTGTGGA	GCCGCCATAG	GAGCCAGAGG	GCTGGCTAGA	360
GCCTGAGAAT	GCAGAAGATG	CTGGAGCCAG	AAAGGAAGCC	TGAGCTGGAG	CTGGATTTCG	420
TGCTGACCGA	AAAGGACTGG	CCAGAGCCGA	AGCTGGCACC	AGGGAACAGT	GAGCATTCTG	480
GGGCCACGCT	TGAGTTCAAC	CCACTGACTT	CAGGTGAAGG	ACTGTGAGCC	AGCTTGAGAA	540
GAGGCTTAC	CAGAGTGGGT	GTCGGGCATG	GGGGCTCGAG	CAGTACCCAG	AGTAGGTGTG	600
GCTAGCCCGG	CCAGGGGTTA	ACGTGGGCGG	TGATTTCAAC	ACAGCTTGGA	AGCCCAAGGC	660
TCGGAGGCCC	GGGTGCTTGG	GCCATTGAG	GAACAGGAGT	CACTCCATCC	CGAGGGGTTT	720
GTCTCACTAC	AATCTTCACA	CGCTTTATT	ATTCAACATG	GTTGGTGCCA	CCTGGTTAGC	780
AGCAAGCGGA	AGGCTGAGGC	CAGTAAGGGC	AGGGGTGTTA	CTGGGGGTGG	AAGAAGCCAG	840
CACAGAGACA	GGGTAAGGTC	CAGGGGTCCG	GGCCACGGCC	TGGATGAGGC	CCCATGCGGC	900
AGGCTGGCTG	ATGAGATGGT	GCTGCCCCCC	TGCTGACACG	AGGTGACCTA	CATTCTTTTG	960
CAGCGGCGCG	GCTGCCCCAC	AGCAAGCTGG	CGCAGCTGGG	CACCATCCAA	AATACAGCTT	1020

```

GTTTCCCTGG ATTGGAAGG TGAGAAGTTT GCTTCCCTCT CCATTAACCA CTGACCTTGT 1080
GCCAGTGAGA CTAACCTCTC GCGCCAATCT GTCCGCGGCT GACCTCCTTC GCGGGCCTGC 1140
CCTACCTCTT CCTCATGTTT CACACTGTTC CCACACAGCC CGACTTTTAC TTGAGGCTGC 1200
GTTCTCTGGG CAGGCTTTC TGACACAAA CTTCACTGCG TCGGTGGCCA CACTGCTGCG 1260
CATGCGCTTG GAGCGGCACC GCACTGTGAT GCGCGTGCAG CTGCACAGCC GCTGCCCCCG 1320
TGGCGCGCTG GTCATGCTCA TTGTGGGCT GTGGGTGGCT GCTTGGGCT TGGGGCTGCT 1380
GCTGCGCCAC TCCTGCACT GCTCTGTGCT CTTGACCGE TCTCACGCA TGGCACCTCT 1440
GCTCAGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1500
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1560
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1620
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1680
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1740
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1800
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1860
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1920
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 1980
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 2040
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 2100
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 2160
GCTGCGCGCC TCTATTGAG CCGTCTGGGC TCTGTGAGC CTGCTTGTCT TCCTGCTCAT 2185

```

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 393 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号4:

```

Met Arg Pro Thr Trp Ala Gly Trp Leu Met Arg Trp Cys Cys Pro
5 10 15
Pro Ala Asp Thr Arg Cys Thr Thr Phe Leu Cys Ser Gly Arg Ala
20 25 30
Ala Pro Gln Gln Ala Gly Ala Pro Gly His His Pro Lys Tyr Ser
35 40 45
Leu Phe Pro Trp Ile Trp Lys Val Arg Gly Leu Leu Pro Pro Pro
50 55 60
Leu Thr Thr Asp Val Val Pro Val Arg Leu Thr Leu Arg Ala Asn
65 70 75
Leu Ser Ala Ala Asp Leu Leu Arg Gly Arg Gly Leu Pro Leu Pro
80 85 90
His Val Pro His Cys Pro Arg Thr Ala Arg Leu Ser Leu Glu Gly
95 100 105
Trp Phe Leu Arg Gln Gly Leu Leu Asp Thr Asn Leu Thr Ala Ser
110 115 120
Val Ala Thr Leu Leu Ala Ile Ala Val Glu Arg His Arg Ser Val
125 130 135
Met Ala Val Gln Leu His Ser Arg Leu Pro Arg Gly Arg Val Val
140 145 150
Met Leu Ile Val Gly Val Trp Val Ala Ala Leu Gly Leu Gly Leu
155 160 165
Leu Pro Ala His Ser Trp His Cys Leu Cys Ala Leu Asp Arg Ser
170 175 180
Ser Arg Met Ala Pro Leu Leu Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Val Trp
185 190 195
Ala Leu Ser Ser Leu Leu Val Phe Leu Leu Met Val Ala Val Tyr
200 205 210

```

Thr	Arg	Ile	Phe	Phe	Tyr	Val	Arg	Arg	Arg	Val	Gln	Arg	Met	Ala	
				215					220					225	
Glu	His	Val	Ser	Cys	His	Pro	Arg	Tyr	Arg	Glu	Thr	Thr	Leu	Ser	
				230					235					240	
Leu	Val	Lys	Thr	Val	Val	Ile	Ile	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Val	Cys	
				245					250					255	
Trp	Thr	Pro	Gly	Gln	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Cys	
				260					265					270	
Glu	Ser	Cys	Asn	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Phe	Leu	Leu	Leu	
				275					280					285	
Ala	Glu	Pro	Thr	Ser	Leu	Val	Asn	Ala	Ala	Val	Tyr	Ser	Cys	Arg	
				290					295					300	
Asp	Ala	Glu	Met	Arg	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	
				305					310					315	
Val	Pro	Pro	Pro	Val	His	Pro	Arg	Val	Cys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Leu	
				320					325					330	
Cys	Pro	Gly	Arg	Cys	Gln	His	Ser	His	His	Ala	Ser	Arg	Glu	Arg	
				335					340					345	
Pro	Pro	Thr	Asp	Gly	Leu	His	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Asn	Tyr	Ser	
				350					355					360	
Gly	Thr	Arg	Gln	Ala	Thr	Asn	Pro	Gln	Pro	Leu	Met	Thr	Cys	Gly	
				365					370					375	
Cys	Ser	Trp	Leu	Asn	Pro	Thr	Ser	Cys	Arg	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	
				380					385					390	
Gly	Ile	His													

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 1474塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(x1) 配列: 配列番号5:

CGGCACGAGC	ATAAGAAGAC	AGAGAGAACT	GAGTATCCTC	CCAAAGGTGA	CACTGGAAAC	60
AATGAACACC	ACAGTAATGC	AAGCCTTGAA	CAGATCTAAG	CGGTGCCCA	AAGACACTCG	120
GATAGTACAG	CTGOTATTCC	CAGCCCTCTA	CACAGTGOTT	TTCTTGACCG	CAATCCTGCT	180
GAATACTTTG	GCTCTGTGGG	TGTTTGTTC	CATCCCCAGC	TGGTCCACCT	TCATCATCTA	240
CCTCAAAAC	ACTTTGTGTG	CCGACTTGAT	AATGACAATG	ATGCTTCCTT	TCAAAATCCT	300
CTCTGACTCA	CACCTGGCAC	CCTGGCAGCT	CAGAGCTTTT	GTGTGTGGTT	TTTCTTCGGT	360
GATATTTTAT	GAGACCATGT	ATGTGGGCAT	AGTCTGTGTA	GGGCTCATAG	CCTTTCACAG	420
ATTCTCTCAG	ATCATCAGAC	CTTTGAGAAA	TATTTTCTTA	AAAAAACCTG	TTTGGGGAAA	480
AACGOTCTCA	ATCTTCATCT	GTTTCTTTTG	GTTCTTCATC	TCCCTGCCAA	ATATGATCTT	540
GAGCAACAGG	GAAGCAACAC	CATCGTCTGT	GAAGAGGTGT	GCTTCTCTTA	AGGGGCTCT	600
GGGGTGAAA	TGGCATCAAA	TGGTAAATAA	CATATGCCAG	TTTATTTTCT	GGACTGTTTT	660
TATCCTAATG	CTTGTTTTTT	ATGTGTTTAT	TGCAAAAAAG	TATATGATTC	TTATAGAAAG	720
TCCAAAAGTA	AGGACAGAAA	AAACAACAAA	AAGCTGGAAG	GCAAGTATT	TGTTGTGGTG	780
GCTGTCTTCT	TTGTGTGTTT	TGCTCCATTT	CATTTCGCCA	GAGTTCCTTA	TACTCACAGT	840
CAAAACCAAC	ATAAGACTGA	CTGTAGACTG	CAAAATCAAC	TGTTTATTGC	TAAAGAAACA	900
ACTCTCTTTT	TGGCAGCAAC	TAACATTTGT	ATGGATCCCT	TAAATATCAT	ATTCTTATGT	960
AAAAAATTCA	CAGAAAAGCT	ACCATGTAAT	CAAGGAGAAA	AGACCAACGC	ATCAAGCCAA	1020
GAATATCATA	GCAATCAGAC	AGACAACATA	ACCTTAAGCT	GACAACTGTA	CATAGGGGTA	1080
ACTTCTATTT	ATTGATGAGA	CTTCCGTAGA	TAAATGTGAA	ATCCAATTTA	ACCAAGAAAA	1140
AAAGATTGGG	GCAAAATGCT	TCTTACATTT	TATTATCCTG	GTGTACAGAA	AAGATTATAT	1200
AAATTTTAAA	TCCACATAGA	TCTATTTCATA	AGCTGAATGA	ACCATTACTA	AGAGAATGCA	1260

(2) 配列番号 6 の情報:

(A)長さ: 293アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C) 錯の数；

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号6：

Met	Asn	Thr	Thr	Val 5	Met	Gln	Gly	Phe	Asn 10	Arg	Ser	Lys	Arg	Cys 15
Pro	Lys	Asp	Thr	Arg 20	Ile	Val	Gln	Leu	Val 25	Phe	Pro	Ala	Leu	Tyr 30
Thr	Val	Val	Phe	Leu 35	Thr	Gly	Ile	Leu	Leu 40	Asn	Thr	Leu	Ala	Leu 45
Trp	Val	Phe	Val	His 50	Ile	Pro	Ser	Ser	Ser 55	Thr	Phe	Ile	Ile	Tyr 60
Leu	Lys	Asn	Thr	Leu 65	Val	Ala	Asp	Leu	Ile 70	Met	Thr	Leu	Met	Leu 75
Pro	Phe	Lys	Ile	Leu 80	Ser	Asp	Ser	His	Leu 85	Ala	Pro	Trp	Gln	Leu 90
Arg	Ala	Phe	Val	Cys 95	Arg	Phe	Ser	Ser	Val 100	Ile	Phe	Tyr	Glu	Thr 105
Met	Tyr	Val	Gly	Ile 110	Val	Leu	Leu	Gly	Leu 115	Ile	Ala	Phe	Asp	Arg 120
Phe	Leu	Lys	Ile	Ile 125	Arg	Pro	Leu	Arg	Asn 130	Ile	Phe	Leu	Lys	Lys 135
Pro	Val	Trp	Gly	Lys 140	Thr	Val	Ser	Ile	Phe 145	Ile	Trp	Phe	Phe	Trp 150
Phe	Phe	Ile	Ser	Leu 155	Pro	Asn	Met	Ile	Leu 160	Ser	Asn	Lys	Glu	Ala 165
Thr	Pro	Ser	Ser	Val 170	Lys	Lys	Cys	Ala	Ser 175	Leu	Lys	Gly	Pro	Leu 180
Gly	Leu	Lys	Trp	His 185	Gln	Met	Val	Asn	Asn 190	Ile	Cys	Gln	Phe	Ile 195
Phe	Trp	Thr	Val	Phe 200	Ile	Leu	Met	Leu	Val 205	Phe	Tyr	Val	Val	Ile 210
Ala	Lys	Lys	Tyr	Met 215	Ile	Leu	Ile	Glu	Ser 220	Pro	Lys	Val	Arg	Thr 225
Glu	Lys	Thr	Thr	Lys 230	Ser	Trp	Lys	Ala	Lys 235	Tyr	Leu	Leu	Ser	Trp 240
Leu	Ser	Ser	Leu	Cys 245	Val	Leu	Leu	His	Phe 250	Ile	Ser	Pro	Glu	Phe 255
His	Ile	Leu	Thr	Val 260	Lys	Pro	Thr	Ile	Arg 265	Leu	Thr	Val	Asp	Cys 270
Lys	Ile	Asn	Cys	Leu 275	Leu	Leu	Lys	Lys	Gln 280	Leu	Ser	Phe	Trp	Gln 285
Gln	Leu	Thr	Phe	Val 290	Trp	Ile	Pro							

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 1301塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号7:

```

TTTTGGGTAT TTCTGAGAAA AAGGAAATAT TTATAAAACC ATCCAAAGAT CCAGATAATT 60
TGCAAAATAA TTGGAGGTTA TAGAGGTTAT AATCTGAATC CCAAAAGAGA CTGCAGCTGA 120
TGAAGGTGCT TCCAAACTGA AAATTGGACG TGCCCTTACG ATGCTAAGCG TTACAGCTC 180
CCACTGCTTC TATAATGACT CCTTTAAGTA CACTTTGTAT GGGTGCATGT TCAGCATGCT 240
GTTTGTGCTT GGGTTAATAT CCAATTGTGT TGCCATATAC ATTTTCATCT GCGTCCCTCA 300
AGTCCGAAAT GAAACTACAA CTTACATGAT TAACCTGGCA ATGTGAGACT TGCTTTTGT 360
TTTTACTTTA CCCTTCAGGA TTTTITACTT CACAAACGGG AATTGGCCAT TTGGAGATTT 420
ACTTTGTAAG ATTTCTGTGA TCTGTTTTAA TACCAACATG TACGGAAGCA TTCTGTTCTT 480
AACCTGTATT AGTGTAGATC GATTCTGGC AATTGTCTAC CCATTTAAGT CAAAGACTCT 540
AAGAACCAAA AGAARTGCAA AGATTGTTG ACATGGCGTG TGGTTAACTG TGAATCGGAG 600
AAGTGCACCC GCCGTTTTTG TTCAGTCTAC CCCTCTCAG GGTAAACAAT CCTCAGAGGC 660
CTGCTTTGAA AATTITCCAG AAGCCACATG GAACACATAT CTCTCAAGGA TTGTAAATTT 720
CATCGAAATA CTCGGATTIT TTATTCCTCT AATTITAAAT GTAACCTGTT CTAGTATGTT 780
GCTAAAAACT TTAACCAAC CTGTZACATT AACTAGAAGC AAAATAAACA AACTAAGGTT 840
TTTAAAAATG ATTTTGTAC ATTTGATCAT ATTCTGTTTC TGTITGTTTC CTTACAATAT 900
CAATCTTATT TTATATTCTC TTGTGAGAAC ACAAACATTT GTTAATTTCT CAOTAGTGGC 960
AGCAGTAAGG ACAATGTACC CAATCACTCT CTGTATTGCT GTTTCCAACT GTTGTTTTGA 1020
CCCTATAGTT TACTACTTTA CATCGGACAC AATTGAGGAT TCAATAAATA TGAATAACTG 1080
CTCTGTCCAG AGAAGTGACT TCAGATTCTC TGAAGTTTCA GGTGCAGAGA ATTTTATTCA 1140
GCATAACCTA CAGACCTTAA AAAGTAAGAT ATTTGACAAAT GAATCTGCTG CCTGAATAAA 1200
AACCATTAGG ACTCACTGGG ACAGAACCTT CAATTCCTTT CAACGTGAA AAGTGTCTTT 1260
TTGGACAAAC TATTTTTCCT CCTCCAAAG AAATTAACAC A

```

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 344アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号8:

```

Met Val Ser Val Asn Ser Ser His Cys Phe Tyr Asn Asp Ser Phe
5 10 15
Lys Tyr Thr Leu Tyr Gly Cys Met Phe Ser Met Val Phe Val Leu
20 25 30
Gly Leu Ile Ser Asn Cys Val Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Cys Val
35 40 45
Leu Lys Val Arg Asn Glu Thr Thr Thr Tyr Met Ile Asn Leu Ala
50 55 60
Met Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Thr Leu Pro Phe Arg Ile Phe
65 70 75
Tyr Phe Thr Thr Arg Asn Trp Pro Phe Gly Asp Leu Leu Cys Lys
80 85 90
Ile Ser Val Met Leu Phe Tyr Thr Asn Met Tyr Gly Ser Ile Leu
95 100 105
Phe Leu Thr Cys Ile Ser Val Asp Arg Phe Leu Ala Ile Val Tyr
110 115 120

```

Pro Phe Lys Ser Lys Thr Leu Arg Thr Lys Arg Asn Ala Lys Ile	125	130	135
Val Cys Thr Gly Val Trp Leu Thr Val Ile Gly Gly Ser Ala Pro	140	145	150
Ala Val Phe Val Gln Ser Thr His Ser Gln Gly Asn Asn Ala Ser	155	160	165
Glu Ala Cys Phe Glu Asn Phe Pro Glu Ala Thr Trp Lys Thr Tyr	170	175	180
Leu Ser Arg Ile Val Ile Phe Ile Glu Ile Val Gly Phe Phe Ile	185	190	195
Pro Leu Ile Leu Asn Val Thr Cys Ser Ser Met Val Leu Lys Thr	200	205	210
Leu Thr Lys Pro Val Thr Leu Ser Arg Ser Lys Ile Asn Lys Thr	215	220	225
Lys Val Leu Lys Met Ile Phe Val His Leu Ile Ile Phe Cys Phe	230	235	240
Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ile Asn Leu Ile Leu Tyr Ser Leu Val	245	250	255
Arg Thr Gln Thr Phe Val Asn Cys Ser Val Val Ala Ala Val Arg	260	265	270
Thr Met Tyr Pro Ile Thr Leu Cys Ile Ala Val Ser Asn Cys Cys	275	280	285
Phe Asp Pro Ile Val Tyr Tyr Phe Thr Ser Asp Thr Ile Gln Asn	290	295	300
Ser Ile Lys Met Lys Asn Trp Ser Val Arg Arg Ser Asp Phe Arg	305	310	315
Phe Ser Glu Val His Gly Ala Glu Asn Phe Ile Gln His Asn Leu	320	325	330
Gln Thr Leu Lys Ser Lys Ile Phe Asp Asn Glu Ser Ala Ala	335	340	

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 30塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号9:

GACTAAAGCT TAATGAGTAG TGAAATGGTG

30

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 31塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号10:

GAACCTCTAG ACCCTCAGGG TTGTAAATCA G

31

(2) 配列番号 1 1 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 30 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 1 1:

GACTAAAGCT TAATGAGGCC CACATGGCA

30

(2) 配列番号 1 2 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 32 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 1 2:

GAACTTCTAG ACGAACTAGT GGATCCCCC GG

32

(2) 配列番号 1 3 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 30 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 1 3:

GACTAAAGCT TAATGGCGTC TTTCTCTGCT

30

(2) 配列番号 1 4 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 30 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi)配列：配列番号14：

GAACCTTCTAG ACTTCACACA GTTGTAATAT

30

(2)配列番号15の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：30塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド

(xi)配列：配列番号15：

GACTAAAGCT TAATGGTAAG CGTTAACAGC

30

(2)配列番号16の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：31塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド

(xi)配列：配列番号16：

GAACCTTCTAG ACTTCAGGCA GCAGATTCAT T

31

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：34塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド

(xi)配列：配列番号17：

GTCCAAGCTT GCCACCATGA GTAGTGAAAT GGTG

34

(2)配列番号18の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：58塩基対

(B)型：核酸

- (C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド
(xi)配列：配列番号18：

CTAGCTCGAG TCAAGCCTAG TCTGGGACGT CGTATGGGTA GCAGGTTGT AATCAGG 58

(2)配列番号19の情報：

- (i)配列の特色：
(A)長さ：34塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド
(xi)配列：配列番号19：

GTCCAAGCTT GCCACCATGG TTGGTGGCAC CTGG 34

(2)配列番号20の情報：

- (i)配列の特色：
(A)長さ：58塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド
(xi)配列：配列番号20：

CTAGCTCGAG TCAAGCCTAG TCTGGGACGT CGTATGGGTA GCAGTGGATC CCCCCTGC 58

(2)配列番号21の情報：

- (i)配列の特色：
(A)長さ：34塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：オリゴヌクレオチド
(xi)配列：配列番号21：

GTCCAAGCTT GCCACCATGA ACACCACGT AATG 34

(2)配列番号22の情報：

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 61 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 22:

CTAGCTCGAG TCAAGCGTAG TCTGGGACGT CGTATGGGTA GCAAGGGATC CATACAAATG 60
T 61

(2) 配列番号 23 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 34 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 23:

GTCCAAGCTT GCCACCATGG TAAGCGTTAA CAGC 34

(2) 配列番号 24 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 61 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 24:

CTAGCTCGAG TCAAGCGTAG TCTGGGACGT CGTATGGGTA GCAAGGCAGCA GATTCAATTGT 60
C 61

(2) 配列番号 25 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 30 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: オリゴヌクレオチド

(xi) 配列: 配列番号 25:

CGGGATCCCT CCATGAGTAG TGAAATGGTG 30

(2) 配列番号 26 の情報 :

(i) 配列の特色 :

(A) 長さ : 29 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : オリゴヌクレオチド

(xi) 配列 : 配列番号 26 :

CGGGATCCCG CTCAGGGTTC TAAATCAGG

FIG. 1A

FIG. 1B に合わせる

[図1]

FIG. 1B

FIG. 1A に合わせる

V C I T L G I T S W T C G S L L A M V H
 610 630 650
 TGTGAGCCTCATCCTAAGACTGCCCCCTTTGTGGCCCTCGTGAATCAACCACTTCTCTG
 V S L I L R L P F C G P R E I N H F F C
 670 690 710
 TGAATCCTGTCTGTCTCAGGCTGGCCTGCTGATACCTGGCTCAACCAAGTGGTCAT
 E I L S V L R L A C A D T W L N Q V V I
 730 750 770
 CTTTGaAGCCTGCATGTTTCATCCTGGTGGGACCACCTCTGCCCTGGTGGTCTCCTACTC
 F E A C M F I L V G P L C L V L V S Y S
 790 810 830
 ACACATCCTGGGGGCATCCTGAGGATCCAGTCTGGGAGGGCCGCAGAAAGGCCCTTCTC
 H I L G G I L R I Q S G E G R R K A F S
 850 870 890
 CACCTGCTCCTCCACCTCTGCGTAGTGGGACTCTTCTTTGGGAGGCCCATCGTCATGTA
 T C S S H L C V V G L F F G S A I V M Y
 910 930 950
 CATGGCCCCCTAAGTCCCGCCATCCTGAGGAGCAGCAGAAGGTCCCTTTCTATTATTACA
 M A P K S R H P E E Q Q K V L F L I L Q
 970 990 1010
 GTTCCTTTCAACCCCGATGCTTAACCCCTGATTACAAACCCCTGAGGAATGTAGAGGGT
 F L S T P M L K P P D L Q P *
 1030 1050 1070
 CAAGGgtGCCCTCCGAGGAGACCACTGTGCAARGAAGTCAATCCTAAGGGGTGTGACAT
 1090 1110 1130

FIG. 1C に合わせる

【図1】

FIG. 1C

FIG. 1B に合わせる

TTGAACTGCCAGCCCCAGTTGCCCGTGGACTCCTGATGCCCAATTATTGCTCAAGCCA
 1150 1170 1190
 GAAAAGTTTACTCCCCCTTAACTGTGCTTTTACTGACAGAGGGCAAGCCTTCTCCCGTTT
 1210 1230 1250
 TTTGCCAGATAAAATTTTAGATGTGTGGCAATCATTTGGGTTTCTAGGAGATGTGGTTTAT
 1270 1290 1310
 CAGACAAATTTTCTTTTATTTCACAAATTACITTTAATATCTGTAAATAAAGAAATTATTT
 1330 1350 1370
 TAAATCATTTTCCCAGTCCCAGTTAAATATACAGGCCACTTACTTCTTTTAACCAATGA
 1390 1410 1430
 TATAGTTTGGCTCTGTGTCCCCACCCAAATCTCATGTCAAAATTGTAAATCCCCGCATGTCA
 1450 1470 1490
 GCGGAGGGACCTGGTGGGAGGTGATTGGATCATGGGGAGGGATTTCCTCCCTTGTCTTCT
 1510 1530 1550
 GTTGATAGTGAACGAGTTCTCAGGAAATCTGATGGTTTAAAGTGCAGCCTTCTCCCTT
 1570 1590 1610
 TGCTCTCTCTCTCTCTGTGTGCCATGTGTAGACGTGCCCTTGTCCCTGGTGTTCGGC
 1630 1650 1670
 CATGATTGTACCTTTCTCTGAGGCCCTCTCCAGCCATGTGGAACTGTGAGCCCAATTAACTT
 1690 1710
 CTTTTCTTTAGAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

[図2]

FIG. 2A

10 TCACATAGGGCGGAATTGGGTACGGCCCCCTCGAGGTGACGGTATCGATAAGCTTG 50
 70 ATATCGAATTTCGGCACGAGCCGGGCTCGGAGAGGTGACGGAAACCGGGGCTGGTAGCATAG 110
 130 TTTGATTGTGATGGAGCCAAACACAGGGGCTTGGAGCTGGTACCGGTGAAGCTGAGGCTA 170
 190 AAAAGGTTCTCTGGAGTAGACGATGGAGCCATAACTGGAACCGGAGTCTGTGAATGAAGCC 230
 250 AGGACAGGAGCAGCACCTGGCGATGGTGCCAGGACCGGAAGAGGAGCCAGAGGAGGAGCT 290
 310 GGAGAAGGAGCCAGAAATTGCTGTGTGGAGCCGCCATAGGAGCCAGAGGGGTGGCTAGA 350
 370 GCCTGAGAAATGCCAGAAAGATGCTGGAGCCAGAAAGGGAAGCCCTGAGCTGGAGCTGGATTGG 410
 430 TGCTGACGGAAAGGACTGGCCAGAGCCGAAAGCTGGCACCAAGGACAGGTGAGCAATTCTG 470
 490 GGGCCACGGTTGAGTTCAACCCACTGACTTTCAGGTGAAGGACTGTGGACCCAGCTTGAGAA 530
 550 GAGGCCCTCACCAGAGTGGGTGTGGGGCATGGGGGCTCGAGCAGTACCCAGAGTAGGTGTG 590
 610 GGTAAGCCCGGCCAGGGGTTAACGTGGGGCGGTGATTCAACACAGCTTGGAGAGCCCCAGAGC 650
 670 TCGGAGGCCCGGGTGCTTGGGCCAATTGAGGAAACAGGAGTCAGTCCATCCGAGGGGGTT 710
 730 GTCTCACTACAAATCTTCACAGCCCTTTATTATTACCATGGTTGGTGGCACCTGGTTAGC 770
 790 AGCAAGCGGAAGGCTGAGGCCAATAGGGGACAGGGGTGTTACTGGGGGTGCGAAGAAGCCAG 830

FIG. 2B に合わせる

[図 2]

FIG. 2B

FIG. 2A に合わせる

850 CACAGACAGGGGTAGGGCCAGGGGTCTGGGGCCACGGCTGATGAGGCCACATGGGC
 870 M R P T W A
 910 AGGCTGGCTGATGAGATGGTGTGCCCCCTGCTGACACGAGGTGCACCATTCCTTTG
 930 G W L M R W C C P P A D T R C T T F L C
 970 CAGCGGGCTGCCCCACAGCAAGCTGGCGCACCTGGCGCACCATCCAAATACAGCTT
 990 S G R A A P Q Q A G A P G H P K Y S L
 1010 GTTCCCTGGATTGGGAAGGTGAGAGGTTTGTCTCCCTCCATTACCACTGACGTTGT
 1030 F P W I W K V R G L L P P P L T T D V V
 1050
 1070
 1090 GCCAGTGAGACTAATCTCCGGGCCAATCTGTCCGGCTGACCTCTTCGGGGCGTGG
 1110 P V R L T L R A N L S A A D L L R G R G
 1130 OCTACCTCTTCCTCATGTCCACACTGTCCCGCACAGCCCGACTTTCACCTGAGGGCTG
 1150 L P L P H V P H C P R T A R L S L E G W
 1170
 1190 GTTCTGGCGCAGGGCTTGCTGGACACAAACCTCACTGCGTGGTGGCCACACTGCTGGC
 1210 F L R Q G L L D T N L T A S V A T L L A
 1230
 1250 CATCGCCGTGGAGCGCACCGCAGTGTGATGGCGTGCAGCTGCACAGCCGCTGCCCCG
 1270 I A V E R H R S V M A V Q L H S R L P R
 1290
 1310 TGGCCGCGTGGTTCATGTCGCGGTGGGTGGCTGCCCTGGGCTGGGGCTGCT
 1330 G R V V M L I V G V W V A A L G L L
 1350
 1370
 1390

FIG. 2C に合わせる

[図2]

FIG. 2C

FIG. 2B に合わせる

GCCTGCCACTCCTGGCACTGCCTCTGTGTGCCCTGGACCGCTCCTCAGCATGGCACCCCT
 P A H S W H C L C A L D R S S R M A P L
 1450 1470 1490
 GCTCAGCCGCTCCTATTGGCCGCTCTGGCTCTGTGAGCCTGCTTCTCCTGCTCAT
 L S R S Y L A V W A L S S L V F L L M
 1510 1530 1550
 GGTGGCTGTGTACACCCGCAATTTCTTCTACGTGCGGCGGAGTGCAGCGCATGGCAGA
 V A V Y T R I F F Y V R R R V Q R M A E
 1570 1590 1610
 GCATGTCAGCTGCCACCCCGCTACCGAGAGACCGCTCAGCCTGGTCAAGACTGTGT
 H V S C H P R Y R E T T L S L V K T V V
 1630 1650 1670
 CATCATCCTGGGGCGTTCTGTGTCTGTGGACACCGCCAGGTGTACTGCTCCTGGA
 I I L G A F V V C W T P G Q V V L L L D
 1690 1710 1730
 TGGTTTAGGCTGTGAGTCTCTGCAATGTCCTGGCGTTAGAAAGTACTTCTCTACTGTGGC
 G L G C E S C N V L A L E K Y F L L L A
 1750 1770 1790
 CGAGCCACCTCACTGGTCAATGCTGCTGTGTACTCTTGCCGAGATGCTGAGATGCGCCG
 E P T S L V N A A V Y S C R D A E M R R
 1810 1830 1850
 CACCTTCGCGCGCTTCTCCTGCTGCGGTGCTCGCCAGTCCACCGGAGTCTGTCC
 T F R R L L L L R V P P P V H P R V C P

FIG. 2D に合わせる

【図2】

FIG. 2D

FIG. 2C に合わせる

```

1870      1890      1910
ACTATACATCCTCTGCCAGGGAGGTGCCAGCACTCGCATCATGCTTCCCGAGAACGGCC
L Y I L C P G R C Q H S H A S R E R P
1930      1950      1970
ACCCACTGATGGACTCCACCCCTTTAGCTACCTTGAACACTACAGCGGTACCGCGCAAGCAAC
P T D G L H P L A T L N Y S G T R Q A T
1990      2010      2030
AAATCCACAGCCCCCTGATGACTTGTGGGTGCTCTGGCTCAACCCCAACCTCGTGCCGAAT
N P Q P L M T C G C S W L N P T S C R I
2050      2070      2090
TCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGCGGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCT
P A A R G I H *
2110      2130      2150
TTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAAATTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
2170
CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC

```

[図 3]

FIG. 3A

10 CGGCACGACATAGAAGACAGAGAGAACTGAGTATCCTCCAAAGGTGACACTGGAAGC 50
 70 AATGAACACCCACAGTAATGCAAGGCTTCAACACAGATCTAAGCGGTGCCCCAAAGACACTCG 110
 M N T T V M Q G F N R S K R C P K D T R
 130 GATAGTACAGCTGGTATCCAGCCCTCTACACAGTGGTTTCTTGACCGGAATCCTGCT 170
 I V Q L V F P A L Y T V V F L T G I L L
 190 GAATACTTTGGCTCTGTGGGTGTTGTTTCACATCCCCAGCTCCTCCACCTTCATCAICTA 230
 N T L A L W V F V H I P S S S T F I I Y
 250 CCTCAAAACACTTTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCATGCTTCTTCAAAATCCT 290
 L K N T L V A D L I H T L M L P F K I L
 310 CTCGTACTCACACCTGGCACCCCTGGCAGCTCAGAGCTTTTGTGTGCTGTTTCTTCGGT 350
 S D S H L A P W Q L R A F V C R F S S V
 370 GATATTTATGAGACCATGTATGTGGGCATCGTCTGTAGGGCTCATAGCCTTTTGACAG 410
 I F Y E T M Y V G I V L L G L I A : F D R
 430 ATTCCTCAAGATCATCAGACCTTTGAGAAATATTTTCTAAATAAACCTGTTCGGGAAA 470
 F L K I I R P L R N I F L K R P V W G K
 490 AACGGTCTCAATCTTCATCTGGTTCCTTTTGGTTCTTTCATCTCCCTGCCAAATATGATCTT 530
 T V S I F I W F F W F F I S L P N M I L
 550 570 590

FIG. 3B に合わせる

[図 3]

FIG. 3B

FIG. 3A に合わせる

GAGCAACRAGGAAGCAACACCATCGTCTGTGAAAAAGTGTGCTTCCTTAAAGGGCCCTCT
 S N K E A T P S S V K K C A S L K G P L
 610 630 650
 GGGCTGAATGGCATCAATGGTAATAACATATGCCAGTTATTTCTGGACTGTTTT
 G L K W H Q M V N N I C Q F I F W T V P
 670 690 710
 TATCCTAATGCTTGTGTTTATGTGTTATTCGCAAAAAGTATATGATTCCTTATAGAAAG
 I L M L V F Y V V I A K K Y M I L I E S
 730 750 770
 TCCAAAAGTAAGGACAGAAAAACAACAAGCTGGAAGGCAAGTATTTGTGTCGTG
 P K V R T E K T T K S W K A K Y L L S W
 790 810 830
 GCTGCTCTTTGTGTGTTTGTCTCCATTTCATTTCCGCCAGAGTTCATATACTCACAGT
 L S S L C V L L H F I S P E F H I L T V
 850 870 890
 CAAACCAACAATAAGACTGACTGTAGACTGCAGAAATCAACTGTTTATTCCTAAAGAAACA
 K P T I R L T V D C K I N C L L L K K Q
 910 930 950
 ACTCTCTTTTGGCAGCAACTAACAATTTGTATGGATCCCTTAATATACATATTCCTATGT
 L S F W Q Q L T F V W I P *
 970 990 1010
 AAAAAATTCACAGAAAAGCTACCATGTATGCAAGGGAGAAAGACCACAGCATCAAGCCAA
 1030 1050 1070
 GAAATCATAGCAGTCAGACAGACAACATAACCTTAGGCTGACAACTGTACATAGGGGTA

FIG. 3C に合わせる

【図3】

FIG. 3C

FIG. 3B に合わせる

```
1090      1110      1130
ACTTCTATTATTGATGAGACTTCGCGTAGATAATGTGGAATCCCAATTTAACCAGAAAA
1150      1170      1190
AAAGATTGGGGCAAAATGCTCTCTTACATTTTATTATTATCTGGGTGTACAGAAAAGATTATAT
1210      1230      1250
AAAATTTAAATCCACATAGATCTATTTCATTAAGCTGAATGAACCATTTACTAAGAGAAATGCA
1270      1290      1310
ACAGGATACAAAATGGCCACTAGAGGTCAATTATTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTT
1330      1350      1370
AATTTCAAGAGAGCATTTTCACCTTTTAAACATTTTGGNAAAGACTAAGGAGGAAACGGTATATCCCT
1390      1410      1430
ACAAACCTCCCCCTCCAAACACACCTTCTTTACATTTCTTTTCCACAATTCACATTAACACTACTG
1450      1470
CTTTTGTGCCCCCTTAAATGTAGATTGTGGCTG
```

FIG. 4A

10 TTTTGGGTATTTCTGAGAAAAAGGAAATATTTTATAAAACCATCCAAAGATCCAGATAATT 50
 70 TGCAAAATAAATTGGAGGTATAGAGGTTATAATCTGAATCCCAAGGAGACTGCAGCTGA 110
 130 TGAAAGTGCTTCCAAACTGAATAATTGGACGTGCGCTTTACGATGGTAAGCGTTAAACAGCTC 170
 190 CCACTGCTTCTATATAATGACTCCTTTTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTTCAGCATGGT 230
 250 H C F Y N D S F K Y T L Y G C M F S M V 290
 310 GTTGTGCTTGGGTTAATAATCCAAATTGTGTGTTGCCATATACATTTTTCATCTGCGTCCCTCAA 350
 370 F V L G L I S N C V A I Y I F I C V L K 410
 430 AGTCCGAAATGAAGAACTACAACCTTACATGATTAACCTTGGCAAATGTCAGACTTGTCTTTTGT 470
 490 V R N E T T T Y M I N L A M S D L L F V 530
 550 TTTTACTTTACCCITTCAGGATTTTTCITTCACAACACGGAATTGGCCATTGGAGATT 590
 610 F T L P F R I F Y F T T R N W P F G D L 650
 670 ACTTTGTAAGATTCTGTGATGCTGTTTATATACCAACATGTACGGAAGCATTTCTGTTCTT 710
 730 L C K I S V M L P Y T N M Y G S I L F L 770
 790 AACCTGTATTAGTAGATCGATTTCITGGCAATGTCTACCCATTAAAGTCAAAGACTCT 830
 850 T C I S V D R F L A I V Y P F K S K T L 890

FIG. 4B に合わせる

【図4】

FIG. 4B

FIG. 4A に合わせる

550 AAGAACCAAGAAATGCAAGATTGTTTGCACTGGCGTGTGTTAACTGTGATCGGAGG
 R T K R N A K I V C T G V W L T V I G G
 610
 AAGTGCACCCGCGTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGTAACAATGCCCTCAGAAGC
 S A P A V P V Q S T H S Q G N N A S E A
 670
 CTGCTTTGAAAAATTTCCAGAACCCACATGGGAAACATATCTCTCAAGGATTGTAAATTTT
 C F E N F P E A T W K T Y L S R I V I F
 730
 CATCGAAATAGTGGGATTTTATTCCTCTAATTTTAAATGTAACTTGTCTAGTATGGT
 I E I V G F F I P L I L N V T C S S M V
 790
 GCTAAAACTTTTAACCAACCTGTACATTAGTAGAAGCAAAATAAACAATAAGGT
 L K T L T K P V T L S R S K I N K T K V
 850
 TTTAAAAATGATTTTGTACATTGTATCATATTCTGTTCTGTTTGTTCCTTACATAT
 L K M I F V H L I I F C P C F V P Y N I
 910
 CAATCTTATTTTATATCTCTGTGAGACACAAACATTTGTAAATGCTCAGTAGTGGC
 N L I L Y S L V R T Q T F V N C S V V A

FIG. 4C に合わせる

FIG. 4A に合わせる

FIG. 4C に合わせる

FIG. 4B に合わせる
FIG. 4C

```

970          990          1010
AGCAGTAAGGACAATGTACCCCAATCACTCTCTGTATTGCTGTTCCCACTGTTGTTTGA
A V R T M Y P I T L C I A V S N C C F D
1030          1050          1070
CCCTATAGTTTACTACTTTACATCGGACACAAATTCAGAATTCATAATAAATGAAAACTG
P I V Y Y F T S D T I Q N S I K M K N W
1090          1110          1130
GTCTGTCAGGAGAAGTGACTTCAGATTCTCTGAGTTTCATGGTGCAGAGAATTTTATTCA
S V R R S D F R F S E V H G A E N F I Q
1150          1170          1190
GCATAACCTACAGACCTTAAAGTAAGATATTGACAAATGAAATCTGCTGCCGTGAAATTA
H N L Q T L K S K I F D N E S A A *
1210          1230          1250
AACCATTAGGACTCACTGGGACAGAACTTTCAGTTCTTCAACTGTGAAAAGTGTCCTTT
1270          1290
TTGGACAAACTATTTTCCACCTCCAAAGAAATTAACACA

```

【图 5】

FIG. 5

```

64 FFLSHLAWNIAYACNTVPQMLVNLHPAKPISFAGCMTLDFLFLSFAHT 113
   |||||:|:|||||:|||||:|.||||:|||||.|||||.|||
1 FFLSHLAIVDIAIYACNTVPQMLVNLDPVKPISYAGCMTQTFLELTFAIT 50

114 ECLLLVMSYDRYVAICHPLRYFIIMTWKVCITLGITSWTCGSLAMVHV 163
   |||||:|||||:||||| ||:|:| ||:|:| ||:|:| ||:|:|
51 ECLLLVMSYDRYVAICHPLRYSAIMSWRVCSMAVTSMIIGVLLSLIHL 100

164 SLILRLPFCGPREINHFFCEILSVLRACADTWLNQVWVIFACMFILVGP 213
   |:|.|||||...:||||| |:|:| ||||| ||:|:|:|:|:|:|:|
101 VLLPLPFCVSQKVNHFCEITAILKLACADTHLNETMVLGAVSVLVGP 150

214 LCLVLVSYSYHILGGILRIQSGEGRRKAFSTCSSHLCVWGLFFGSAIVMYM 263
   :::|:|. |||:|:|:|:|:|.|||||:|:|:|:|:|:|:|.|||||:
151 FSSIIVSYACILGAILKIQSEEGQRKAFSTCSSHLCVWGLFYGTAVMYV 200

264 APKSRHPPEEQKVLFLILQFLS 285
   |:|. |.|||. |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
201 GPRHGSPKEQKKYLLLFHSLFN 222

```


FIG. 6B

FIG. 5A に合わせる

```

190 SYLAUWALSSLLVFLLMVAUYTRIFFYVRRVQMA..EHVSCHPRYRET 237
    |: . . |::| :| :|:| :|| | .|: . .::| .| .|
201 HYILFCTTVFTLLLSIVILYCRISLVTRSRRLTFRKVISKASRSSE. 249
238 TLSLVKTVIILGAFVVCWTPGQVLLLD.GLGCESCNVLALEKYFLLLA 286
    .: :| :|:| :|:|:| .|:| | :|:|:| | .|:|:|:|
250 NVALLKTVIIVLSVFIACWAPFLILLLDVGCKVTKCDILFRAEYFLVLA 299
287 EPTSLVNAAVYSCRDAEMKRTFRRLLLLRVPPVHPRVCPLYILCPGRCQ 336
    .| .|: :| . :| :|:| .| | :|:|:|:|
300 VLNSGTNPPIIYTLTKEMRAFIR.....IMSCCKCP 331
337 HSHHASRERPPDGLHPLATLNYSGTR.....QATNPQPLMTCCG 376
    :. |: :| . :|:|:| :| :|:|:|:|:|:|:|
332 SGDSAGKFRPI.....IAGMEFSRSKSDNSSHPQKDEGDNPETIMSSG. 375

377 SWLNPTS 383
    :| .|
376 .NVNSSS 381

```

```

1 1 MNTTVMQGFNRSKRCPKDTRIVQLVFPALYTVVFLTGILLNTLALWVFVH 50
   :./| |.:| |...|. |:|::||:|||||.. |:|..
2 INSTSTQPDES..CSQNLLITQQIIFVLVCMVFIAGILLGVSGWIFFY 49

```

51 IPSSFTIYYLXNTLVADLIMTLMPFKILSDSHLAPWQLRAFCRFSSV 100
:|||..|||||||.::|:|||||:| |:|||..|||.·|

50 VPSSKSFIIYLNKNI VIAD FVMSLTFFPKILGDSGLGPWQLNVFVCRVSAV 99

[illegible]

100 LFYNNMYVSIVFFGLISPDRYKIVKPLWTSFIQSVSYSKLLSVIVMMLM 149

```
151 FFISLEPMILSNKEATPSSVKKCASLKGPLGLKWHOMVNNICQFIFWTVF 200
```

150 LLLAVPNIILTNQSVREVTQIKCIELKSELGRKWKHKAASYIFVAIFWIVF 199
201 ILMVFYVVIARK.YMILIESPKVRTEKTKSWKAKYLLSWLSSLCVL.. 247

```

:|::|||.|| : . :|. :.|. ..||.: : :: :|.:
200 LLLIVFYTAITKKIFKSHLKSSRNSTSVKKKSSRNIFSIVVFVFCVPY 249

```

248LHFISPEFHILTVKPTIRLTVDC.....KINCLLL. 277

250 HIARIPTYKSO TEAHYSCQSKEILRYMKEPTLLS ANVCLDPPIYFFLC 299

```
278 .....KKQLSFWQQ..LTFVWIP 293
      |:::..| |:::|.
```

300 QFREILCKKLHPLKAQNDLISRIK 326

FIG. 7

[圖 8]

6 SSHCFYND SFKYTLYGCMFSMVFLGVISNCVAIYIFICVLKVRNETTTTMINLAMSDDL 65
 SS+C DSFKYTLYGCF+FSMVFLG+I+NCVAIYIF LKVRNETTTTMM+NLA+SDLL
 3 SSNCSTEDSFKYTLYGCVFSMVFLGLIANCAIYIFTTLKVRNETTTTMM+NLAISDDL 62

66 FVFTLPFRIFYFTTRNWPFGDLLCKISVMLFYTNMYGSILFLTCISVDRFLAIVYPFKSK 125
 FVFTLPFRI+YF RNWPFGD+LCKISV LPYTNMYGSILFLTCISVDRFLAIV+PF+SK
 63 FVFTLPFRIYYFVVRNWPFGDVLCKISVTLFYTNMYGSILFLTCISVDRFLAIVHPFRSK 122

126 TLRTKRNAKIVCTGVWLTVIGGSAPAVFVQSTHSQGNNAEACFENFPEATWKTYSRIV 185
 TLRTKRNA+IVC VW+TV+ GS PA F QST+ Q N CFENFPE+TWKTYSRIV
 123 TLRTKRNAIVCVAVWITVLAGSTPASFFQSTNRQNNTQRTCFENFPESTWKTYSRIV 182

186 IFIEIVGFFIPLILNVTCSSMVLKTLTKPVTLSRSKINKTKVLKMFVHLIIFCFCFVPY 245
 IFIEIVGFFIPLILNVTCSS+MVL+TL KP+TLRS+K++K KVLKMFVHL+IFCFCFVPY
 183 IFIEIVGFFIPLILNVTCSTMVLRNLKPLTLNRNKLKSKKVLKMFVHLVIFCFCFVPY 242

246 NINLILYSLVRQTQTFVNCVVAAVRTMYPIITLCIAVSNCCFDPVYYFTSDTNSEFNKNE 305
 NI LILYSL+RTQT++NCSVV AVRTMYP+TLCIAVSNCCFDPVYYFTSDTNSE +K +
 243 NITLILYSLMRTQTWINC SVTAVRTMYPVTLCIAVSNCCFDPVYYFTSDTNSELDDKKQ 302

306 KL 307
 ++
 303 QV 304

FIG. 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US95/04079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C07K 14/705, 16/28; C12N 15/13 US CL : 435/6, 69.1, 252.3, 320.1; 530/350, 388.2; 516/23.5, 24.31 According to International Patent Classification (IPC) as to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) US : 435/6, 69.1, 252.3, 320.1; 530/350, 388.2; 516/23.5, 24.31 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NONE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NATURE, Vol. 361, issued 28 January 1993, K. Raming et al., "Cloning and expression of odorant receptors", pages 353-356, see Figure 1 on page 354.	1-32
A	Proceedings of the National Academy of the Sciences USA, Vol. 89, issued October 1992, P. Nef et al., "Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithellum", pages 8948-8952, see Figure 1 on page 8949.	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may (thereby) be of particular relevance or which is cited to establish the priority date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or obvious in view of the disclosure in the document "Z" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in view of one or more other cited documents, each contribution being obvious in a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 JUNE 1995		Date of mailing of the international search report 19 JUN 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JOHN D. ULM Telephone No. (703) 205-9196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04079

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the inventions first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/U395/04079**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING**

Thus ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claims 1-22 and 23-32, drawn to a nucleic acid encoding a putative receptor protein, the protein encoded thereby, and processes of use.

Group II, claim 23, drawn to an antibody which binds to a protein of Group I.

Group III, claims 24-27, drawn to a compound of undefined structure and chemical composition and methods of using the compound.

The inventions listed as Groups I, II and III do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The protein and nucleic acid of Group I, the antibody of Group II and the compound of Group III are chemically and structurally unrelated and do not share a common technical feature. Accordingly, the claims are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 as to form a single inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/04079

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 16, issued 05 June 1990, T. Hla et al., "An Abundant Transcript Induced in Differentiating Human Endothelial Cells Encodes a Polypeptide with Structural Similarities to G-protein-coupled Receptors", pages 9308-9313, see Figure 2 on page 9311.	1-32
A	Proceedings of the National Academy of the Sciences USA, Vol. 90, issued May 1993, L. Rohrer et al., "Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor", pages 4196-4200, see Figure 1 on page 4197.	1-32
A	FEBS LETTERS, Vol. 298, issued February 1992, N. Iwai et al., "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor", pages 257-260, see Figure 1 on page 258.	1-32
A	SCIENCE, Vol. 244, issued 05 May 1989, F. Liberi et al., "Selective Amplification and Cloning of Four New Members of the G Protein-Coupled Receptor Family", pages 569-572, see entire document.	1-32

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
A 6 1 K 31/70	ACL	A 6 1 K 31/70	ACL
	ADS		ADS
	AED		AED
38/00	ACV	39/395	ACMD
39/395	ACM		ACNN
	ACN	48/00	AAA
48/00	AAA	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705		16/28	
16/28		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/53		A 6 1 K 37/02	ACV

(72)発明者 ニ, ジアン

アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
 ガイザースバーグ, ウェスト サイド ド
 ライブ 305, アpartment ナンバー
 204

(72)発明者 ジェンツ, レイナー

アメリカ合衆国 メリーランド 20904,
 シルバースプリング, フェアランド パ
 ーク ドライブ 13404

(72)発明者 バルト, キャロル ジェイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 20824,
 ローレル, パーク ホール サウス 334

(72)発明者 サットン, グランジャー ジー., ザ サ
ード

アメリカ合衆国 メリーランド 21045,
 コロンビア, スノーマン コート 6409

(72)発明者 ローゼン, クレイグ エイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 20882,
 レイトンズビル, ローリング ヒル ロー
 ド 22400

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成14年8月20日(2002. 8. 20)

【公表番号】特表平11-503012

【公表日】平成11年3月23日(1999. 3. 23)

【年通号数】

【出願番号】特願平8-529302

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 31/70 ABF

ABS

ABU

ACD

ACL

ADS

AED

38/00 ACV

39/395 ACM

ACN

48/00 AAA

C07K 14/705

16/28

C12N 5/10

C12P 21/02

C12Q 1/68

G01N 33/53

【F1】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/70 ABF

ABS

ABU

ACD

ACL

ADS

AED

39/395 ACM D

ACN N

48/00 AAA

C07K 14/705

16/28

C12P 21/02 C

C12Q 1/68 Z
G01N 33/53 D
C12N 5/00 A
A61K 37/02 ACV

手続補正書

平成14年3月19日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成11年特許願第529302号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 メリーランド 20850-3338, ロックビル,

アー ウェスト アベニュー 9410

名称 ヒューマン ジノーム サイエンス・ズ インコーポレイテッド

3. 代理人

住所 〒840-4014 大阪府大阪市中央区城見...丁田2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7528) 井堀士 山本 秀雄

電話(大阪) 06-6040-3010

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します。

請求の範囲

1. 以下からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチド:

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、および配列番号8のポリヌクレオチド、あるいは該ポリヌクレオチドのフラグメント、アナログ、または誘導体をコードするポリヌクレオチド;

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチド、と少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド; および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも10ヌクレオチドを有するフラグメント。

2. 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

3. 前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

4. 前記ポリヌクレオチドがゲノムDNAである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

5. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド:

(a) ATCC細胞番号71981号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド;

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチド、と少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド; および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも10ヌクレオチドを有するフラグメント。

6. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド:

(a) ATCC受託番号第7683号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも60ヌクレオチドを有するフラグメント。

7. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第7687号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも60ヌクレオチドを有するフラグメント。

8. 以下からなる群から選択されるメンバーを含む単離されたポリヌクレオチド：

(a) ATCC受託番号第7679号に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする請求項2に記載のポリヌクレオチド；

(b) (a)のポリヌクレオチドにハイブリダイズし得、かつ該ポリヌクレオチドと少なくとも70%同一であるポリヌクレオチド；および

(c) (a)または(b)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、該フラグメントが少なくとも60ヌクレオチドを有するフラグメント。

9. 配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

10. 配列番号1のヌクレオチド1～ヌクレオチド1773として示されるコード配

列を有する、請求項9に記載のポリヌクレオチド。

11. 配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

12. 配列番号3のヌクレオチド1～ヌクレオチド1148として示されるコード配列を有する、請求項11に記載のポリヌクレオチド。

13. 配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

14. 配列番号5のヌクレオチド1～ヌクレオチド1474として示されるコード配列を有する、請求項13に記載のポリヌクレオチド。

15. 配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

16. 配列番号7のヌクレオチド1～ヌクレオチド1301として示されるコード配列を有する、請求項15に記載のポリヌクレオチド。

17. 請求項2に記載のDNAを含む有するベクター。

18. 請求項17に記載のベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞。

19. ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、請求項18に記載の宿主細胞から該DNAによりコードされる該ポリペプチドを発現させる工程を含む、プロセス。

20. ポリペプチドを発現し得る細胞を産生するためのプロセスであって、請求

項17に記載のベクターを用いて細胞を遺伝子操作する工程を含む、プロセス。

21. 請求項2に記載のDNAとハイブリダイズ可能であり、かつGタンパク質結合レセプター活性を有するポリペプチドをコードする、単離されたDNA。

22. 以下からなる群から選択されるポリペプチド：

(1) 配列番号2、4、6および8の推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、および断片体を含むポリペプチド；

(2) ATCC受託番号第76861号、ATCC受託番号第76883号、ATCC受託番号第76878号、ATCC受託番号第76878号のcDNAによりコードされるポリペプチド、ならびに該ポリペプチドのフラグメント、アナログ、および断片体。

23. 請求項22に記載のポリペプチドに結合する抗体。

24. 請求項22に記載のポリペプチドを活性化させる化合物。

25. 請求項22のポリペプチドの活性化を阻害する化合物。

26. Gタンパク質結合レセプターの活性化の必要を有する感受の促進のための薬理的組成物であって、請求項24に記載の化合物の治療有効量を含む、薬学的組成物。

27. Gタンパク質結合レセプターの活性化を阻害する必要を有する感受の阻害のための薬理的組成物であって、請求項25に記載の化合物の治療有効量を含む、薬学的組成物。

28. 前記ポリペプチドはGタンパク質結合レセプターの可溶性フラグメントで

あり、そしてレセプターのリガンドに結合し得る、請求項22に記載のポリペプチド。

29. 請求項22に記載のポリペプチドに結合するアンタゴニストおよびアゴニストを決定するためのプロセスであって：

Gタンパク質結合レセプターを発現する細胞と既知のレセプターリガンドおよびスクリーニングされるべき化合物とを接触させる工程；および
該化合物が該レセプターの活性化を促進するか、または増進するかを決定する工程、を含む、プロセス。

30. 請求項22に記載のポリペプチドに結合し得ることが公知でないリガンドが該ポリペプチドに結合し得るかを決定するためのプロセスであって：

Gタンパク質結合レセプターを発現する哺乳動物細胞と推定リガンドとを接触させる工程；
該レセプターに結合する前記リガンドの存在を検出する工程；および
該リガンドが該Gタンパク質結合レセプターに結合するかを決定する工程、を含むプロセス。

31. 宿主由来のサンプル中の請求項22に記載のポリペプチドをコードする該遺伝子における変異を検出する工程を含む、疾患または疾患に対する感受性を診断するための方法。

32. 宿主由来のサンプル中の請求項22に記載のポリペプチドの存在を分析する工程を含む、診断プロセス。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.